

**PURIFICATION ET CARACTÉRISATION DE  
L'ATP-DIPHOSPHOHYDROLASE DU COEUR DE BOEUF**

par

Francis Levesque

mémoire présenté au département de biologie en vue  
de l'obtention du grade de maîtrise ès sciences (M. Sc.)

FACULTÉ DES SCIENCES  
UNIVERSITÉ DE SHERBROOKE

Sherbrooke, Québec, Canada, décembre 1996



National Library  
of Canada

Acquisitions and  
Bibliographic Services

395 Wellington Street  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

Bibliothèque nationale  
du Canada

Acquisitions et  
services bibliographiques

395, rue Wellington  
Ottawa ON K1A 0N4  
Canada

*Your file Votre référence*

*Our file Notre référence*

The author has granted a non-exclusive licence allowing the National Library of Canada to reproduce, loan, distribute or sell copies of this thesis in microform, paper or electronic formats.

The author retains ownership of the copyright in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque nationale du Canada de reproduire, prêter, distribuer ou vendre des copies de cette thèse sous la forme de microfiche/film, de reproduction sur papier ou sur format électronique.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur qui protège cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

0-612-21794-9

## SOMMAIRE

L'ATP et l'adénosine extracellulaire exercent des effets physiologiques importants sur le coeur des mammifères. L'adénosine est un agent dilatateur dans les artères coronaires tandis que l'ATP peut être soit vasodilatateur ou vasoconstricteur selon son site d'action. L'adénosine et l'ATP exercent également des effets électrophysiologiques tel que l'effet chronotrope négatif, l'effet dromotrope négatif et l'effet inotrope négatif. Le contrôle de la concentration des nucléotides extracellulaires est fait par des ectonucléotidases tel que des ATPases, ADPases et la 5'-nucléotidase. Les activités ATPasique et ADPasique ont depuis longtemps été mises en évidence dans les cellules cardiaques. La présence de ces deux types d'activités à la surface des cardiomyocytes a permis d'énoncer l'hypothèse suivante: Une ATP-diphosphohydrolase (ATPDase: EC 3.6.1.5) est responsable de l'activité ADPasique présente à la surface des cellules cardiaques. L'hypothèse repose en grande partie sur le fait que cette enzyme a été mise en évidence dans les vaisseaux sanguins. L'ATPDase, aussi appelée apyrase, est une enzyme responsable de l'hydrolyse séquentielle des groupements  $\gamma$  et  $\beta$  phosphate des triphospho-et diphosphonucléosides. Dans le cas présent, une ATPDase a été purifiée dans les cellules ventriculaires du coeur de boeuf selon une procédure déjà utilisée pour les cellules musculaires lisses de l'aorte et pour les grains de zymogène du pancréas de porc. La procédure de purification comprenait les étapes suivantes: une centrifugation différentielle, une centrifugation sur coussin de sucrose, une solubilisation avec le Triton X-100, des chromatographies sur colonne échangeuse d'anions DEAE-agarose, sur colonne Affi-Gel bleu et sur colonne de Concanavaline A-sepharose. La préparation finale de purification contient deux formes de l'enzyme soit le type I de 54 kDa et le type II de 78 kDa. La spécificité de substrat, la courbe

de dénaturation par la chaleur et la copurification des activités ATPasique et ADPasique confirment l'identité de l'enzyme comme étant une ATPDase. De plus, le gel d'électrophorèse en conditions non-dénaturantes indique une migration identique pour les deux types d'activité. Un western blot effectué avec un anticorps dirigé contre la séquence du N-terminale de l'ATPDase des grains de zymogène du porc démontre une réaction croisée avec l'ATPDase purifiée des cellules du coeur. L'immunolocalisation faite avec ces mêmes anticorps révèle une forte réaction à la surface des membranes plasmiques des cellules myocardiques banales et des fibres de Purkinje de même qu'une faible réaction dans le cytoplasme. Cette enzyme étant reconnue pour être une ectoenzyme, elle semble jouer un rôle majeur, de concert avec la 5'-nucléotidase, au niveau de la conversion de l'ATP extracellulaire en adénosine dans le ventricule du coeur, plus spécifiquement dans les condition d'hypoxie. Ce rôle majeur correspond en fait à l'annulation des effets physiologiques médiés par les purinorécepteurs  $P_2$  et à l'induction des réponses physiologiques médiés par les purinorécepteurs  $P_1$ .



## REMERCIEMENTS

Je voudrais tout d'abord remercier mon directeur de recherche, M. Adrien Beaudoin pour m'avoir accepté dans son laboratoire et pour m'avoir bien conseillé tout au long de ma maîtrise. Je voudrais aussi remercier mes conseillers, M. Brian Talbot et M. Gilles Grenier pour leur grande disponibilité. Je remercie également Jean Sévigny et Maryse Picher pour leurs précieux conseils techniques. Finalement, je remercie mes parents et ami(e)s qui m'ont encouragé et qui ont cru en moi tout au long de ces deux années.

## TABLE DES MATIÈRES

<b>SOMMAIRE</b>	.....	<b>ii</b>
<b>REMERCIEMENTS</b>	.....	<b>iv</b>
<b>TABLE DES MATIÈRES</b>	.....	<b>v</b>
<b>LISTE DES ABRÉVIATIONS</b>	.....	<b>x</b>
<b>LISTE DES TABLEAUX</b>	.....	<b>xi</b>
<b>LISTE DES FIGURES</b>	.....	<b>xii</b>
<b>INTRODUCTION</b>	.....	<b>1</b>
<b>1. Anatomie et physiologie du coeur</b>	.....	<b>2</b>
1.1. Direction du débit sanguin dans le coeur	.....	4
1.2. Organisation du tissu cardiaque: les cardiomyocytes	.....	6
1.3. Les cellules cardionectrices	.....	6
1.4. Excitation et propagation de l'onde	.....	9

1.5. Contrôle nerveux et hormonal de la fréquence cardiaque .....	11
<b>2. Rôle des nucléotides extracellulaires au niveau du coeur .....</b>	<b>12</b>
2.1. Vasoactivité .....	13
2.2. Effets électrophysiologiques .....	14
<b>3. Les purinorécepteurs .....</b>	<b>17</b>
<b>4. Les ectonucléotidases (ATPases, ADPases et 5'-nucléotidases) .....</b>	<b>19</b>
<b>5. Les ATP-diphosphohydrolases .....</b>	<b>20</b>
<b>6. Hypothèse et objectifs .....</b>	<b>22</b>
<b>CHAPITRE I - MATÉRIEL ET MÉTHODES .....</b>	<b>24</b>
<b>1. Matériel employé .....</b>	<b>24</b>
<b>2. Purification .....</b>	<b>25</b>
2.1. Extraction .....	25

2.2.	Solubilisation .....	26
2.3.	Chromatographie sur colonne .....	26
2.3.1.	Colonne échangeuse d'anions DEAE .....	26
2.3.2.	Colonne d'affinité Affi-Gel Bleu .....	27
2.3.3.	Colonne d'affinité pour les sucres Concanavaleine A .....	28
3.	<b>Dosage de l'activité enzymatique .....</b>	<b>28</b>
4.	<b>Dosage des protéines .....</b>	<b>29</b>
5.	<b>Gel d'électrophorèse SDS-PAGE .....</b>	<b>29</b>
6.	<b>Caractérisation de l'ATPDase .....</b>	<b>30</b>
6.1.	Courbe de pH .....	30
6.2.	Effets des ions divalents ( $\text{Ca}^{++}$ et $\text{Mg}^{++}$ ) .....	30
6.3.	Électrophorèse en conditions non- dénaturantes .....	30
6.4.	Courbe de dénaturation par la chaleur .....	33
6.5.	Spécificité de substrats .....	33
6.6.	Effets de certains inhibiteurs .....	34

6.7. Western blot .....	34
6.8. Immunohistochimie .....	35
<b>CHAPITRE II - RÉSULTATS .....</b>	<b>37</b>
<b>1. Purification .....</b>	<b>37</b>
1.1. Extraction de la fraction particulaire .....	37
1.2. Solubilisation .....	39
1.3. Colonne échangeuse d'ions DEAE .....	39
1.4. Colonne Affi-Gel Bleu .....	41
1.5. Bilan de purification .....	41
<b>2. Caractérisation biochimique .....</b>	<b>45</b>
2.1. pH optimum .....	46
2.2. Besoins en ions divalents ( $\text{Ca}^{++}$ et $\text{Mg}^{++}$ ) .....	46
2.3. $K_m$ et $V_{\max}$ .....	49
2.4. Électrophorèse en conditions non- dénaturantes .....	49
2.5. Inhibiteurs .....	49

2.6. Spécificité de substrats .....	53
2.7. Courbe de dénaturation par la chaleur .....	55
2.8. Western blot .....	55
2.9. Immunohistochimie .....	57
<b>CHAPITRE III - DISCUSSION GÉNÉRALE .....</b>	<b>62</b>
<b>CONCLUSION .....</b>	<b>70</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE .....</b>	<b>72</b>

## LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADP	Adénosine 5'-diphosphate
AMP	Adénosine 5'-monophosphate
AMPC	AMP cyclique
ATP	Adénosine 5'-triphosphate
ATPDase	ATP-diphosphohydrolase
CDP	Cytidine 5'-diphosphate
CTP	Cytidine 5'-triphosphate
GMP	Guanosine 5'-monophosphate
GTP	Guanosine 5'-triphosphate
NAD	Nicotinamide adénosine diphosphate
UDP	Uridine 5'-diphosphate
UTP	Uridine 5'-triphosphate

## LISTE DES TABLEAUX

<b>Tableau 1.</b>	Bilan de l'isolation de la fraction particulaire du ventricule de boeuf .....	38
<b>Tableau 2.</b>	Bilan de purification de l'ATPDase du ventricule de boeuf .....	43
<b>Tableau 3.</b>	Influence de certains inhibiteurs sur l'activité de l'ATPDase .....	52



## LISTE DES FIGURES

<b>Figure 1.</b>	Direction du débit sanguin dans le coeur .....	5
<b>Figure 2.</b>	Organisation d'une cellule myocardique banale .....	7
<b>Figure 3.</b>	Cellules cardionectrices et système de conduction dans le coeur .....	8
<b>Figure 4.</b>	Profil d'élution des protéines et des activités ATPasique et ADPasique de la colonne échangeuse d'ions DEAE .....	40
<b>Figure 5.</b>	Profil d'élution des protéines et des activités ATPasique et ADPasique de la colonne Affi-Gel Bleu .....	42
<b>Figure 6.</b>	Séparation des protéines par SDS-PAGE à différentes étapes de purification .....	44
<b>Figure 7.</b>	Influence du pH sur l'activité de l'ATPDase .....	47
<b>Figure 8.</b>	Influence des ions $\text{Ca}^{++}$ et $\text{Mg}^{++}$ sur l'activité de l'ATPDase .....	48
<b>Figure 9.</b>	Courbe d'Hofstee de l'ATPDase du ventricule de boeuf .....	50
<b>Figure 10.</b>	Profil de migration de l'ATPDase native sous PAGE en conditions non-dénaturantes ..	51

<b>Figure 11.</b>	Spécificité de substrat de l'ATPDase du ventricule de boeuf .....	54
<b>Figure 12.</b>	Effet d'un traitement à la chaleur sur l'activité enzymatique de l'ATPDase .....	56
<b>Figure 13.</b>	Western blot de l'ATPDase .....	58
<b>Figure 14.</b>	Localisation cellulaire de l'ATPDase dans le myocarde par méthode immunohistochimique. ....	59-60
<b>Figure 15.</b>	Localisation de l'ATPDase au niveau des fibres de Purkinje par méthode immunohistochimique .....	59-61

## INTRODUCTION

On connaît depuis longtemps l'influence des nucléotides extracellulaires sur la physiologie cardiaque. En fait, c'est depuis 1929, grâce aux travaux de Drury et Szent-Giorgyi, que l'on sait que l'adénosine exerce des effets physiologiques importants sur le coeur des mammifères. Ces effets sont produits via des récepteurs spécifiques aux purines: les purinorécepteurs, localisés à la surface des cellules (Burnstock, 1978).

La stimulation d'une cellule par les nucléotides extracellulaires dépend d'une multitude de facteurs, dont la concentration des nucléotides environnants et la capacité qu'ont ces cellules à hydrolyser ces nucléotides. Ainsi, l'étude des ectonucléotidases est d'une importance capitale car ces enzymes, situés sur la face externe de la membrane plasmique, exercent un contrôle important sur la concentration des nucléotides extracellulaires (Olsson et Pearson, 1990). Dans la littérature, parmi les activités ectonucléotidases localisées dans le coeur, on retrouve principalement les activités ATPasique, ADPasique et la 5'-nucléotidase (Bowdich *et al.*, 1985; Meghji *et al.*, 1992). Meghji *et al.* (1992) ont suggéré la présence d'une ATP-diphosphohydrolase (ATPDase) à la surface des cardiomyocytes, à cause des types d'activités enzymatiques qu'ils ont observés sur des cellules en culture. Cependant, ils ne l'ont pas démontré. L'ATPDase est une enzyme qui hydrolyse les groupements  $\gamma$  et  $\beta$  phosphates des diphosho- et triphosphonucléosides.

Pour bien comprendre le contexte dans lequel s'effectue la présente étude, il est essentiel de revenir sur les notions de base touchant la physiologie cardiaque. Ainsi, dans l'introduction, il

sera question de l'anatomie et de la physiologie du coeur, des rôles des nucléotides extracellulaires, des ectonucléotidases déjà répertoriés dans cet organe et, pour finir, des ATPDases.

## **1. Anatomie et physiologie du coeur.**

Le coeur est l'organe pulsatile qui est responsable de la circulation du sang dans l'organisme. Les parois du coeur sont principalement composées du muscle cardiaque que l'on appelle le myocarde. Celui-ci possède une couche interne, l'endocarde, et une couche externe, l'épicarde. La surface interne du myocarde (c'est-à-dire la surface en contact avec le sang) est tapissée par une fine couche de cellules endothéliales formant l'endothélium; ce dernier tapisse également la totalité du système vasculaire.

On retrouve principalement deux types de cellules dans le myocarde: 1) les cellules myocardiques banales et 2) les cellules cardionectrices. Les cellules cardionectrices ont comme fonctions d'engendrer le stimulus qui fait battre le coeur et de conduire ce stimulus aux différentes parties du myocarde. Le noeud sino-auriculaire (SA), le noeud auriculoventriculaire (AV) et le faisceau de His, dont les branches forment le réseau de Purkinje, sont composés de ce type de cellules.

Les cellules myocardiques banales sont responsables de la contraction. Comme pour toutes les cellules musculaires, la contraction de ces cellules est dépendante d'une augmentation cytosolique du calcium; cette augmentation en calcium s'effectue suite à une dépolarisation de la membrane plasmique de la

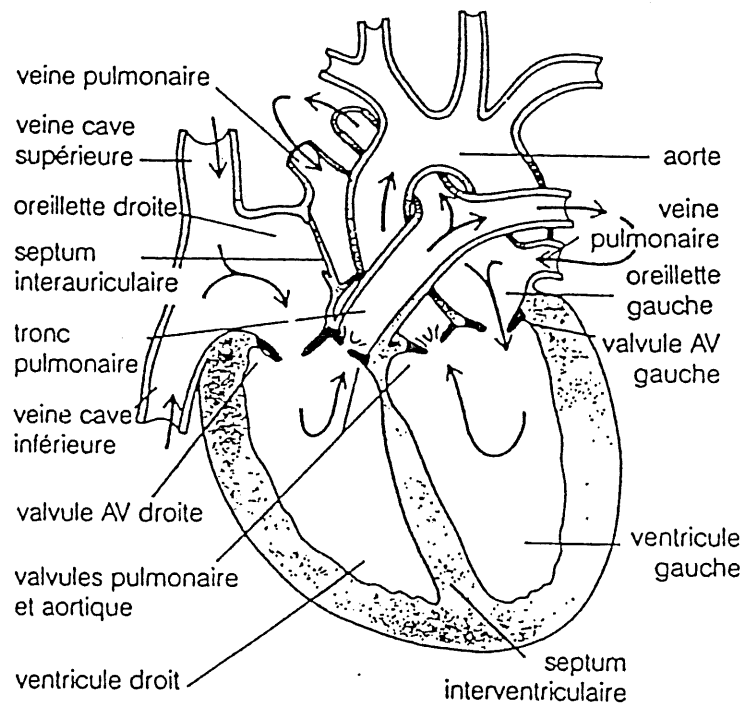
cellule. Il est à noter que les cellules myocardiques banales représentent presque 99% de toutes les cellules du myocarde.

Le coeur est essentiellement divisé en deux parties: le coeur droit où circule le sang veineux et le coeur gauche où circule le sang artériel. Chacune de ces parties est elle-même constituée de deux cavités: une oreillette et un ventricule. La cloison médiane séparant le coeur droit du coeur gauche est appelée le septum. Ainsi, les ventricules gauche et droit, de même que les oreillettes gauche et droite, sont distincts et ne communiquent pas entre eux. Les fibres musculaires striées du myocarde sont supportées par une charpente fibreuse. Cette structure entoure les quatre orifices du coeur en formant des anneaux (cercles tandineux de Lower) sur lesquels s'implantent les valvules (Baillet et Nortier, 1992). Le coeur est enfermé dans un sac fibreux: le péricarde. Un liquide aqueux servant de lubrifiant se retrouve entre le coeur et le péricarde.

Entre les oreillettes et les ventricules, de chaque côté du coeur, se trouvent les valvules auriculo-ventriculaires (valvules AV). Ces structures permettent au sang de circuler des oreillettes vers les ventricules et non l'inverse. La valvule mitrale est celle du coeur gauche et la valvule tricuspide est celle du coeur droit. L'ouverture du ventricule droit dans le tronc pulmonaire et celle du ventricule gauche dans l'aorte, sont protégées par les valvules pulmonaire et aortique.

### **1.1. Direction du débit sanguin dans le coeur.**

La veine cave draine le sang veineux vers l'oreillette droite (figure 1). Ce sang passe ensuite dans le ventricule droit en traversant la valvule tricuspide. L'ouverture et la fermeture des valvules est un processus passif qui s'effectue sous l'effet des différences de pression, de part et d'autre des valvules. Lorsque le sang se déplace de l'oreillette vers le ventricule, la valvule s'ouvre. Cependant, durant la contraction du ventricule, la valvule se ferme sous l'effet de l'augmentation de la pression du sang dans le ventricule. La communication auriculo-ventriculaire est ainsi interrompue. Le ventricule droit propulse le sang dans l'artère pulmonaire, ce dernier véhiculant le sang veineux à travers l'orifice pulmonaire. Le sang entre donc dans la petite circulation (poumons) et revient dans l'oreillette gauche par quatre veines pulmonaires. Le sang oxygéné contenu dans l'oreillette gauche passe dans le ventricule gauche par la valvule mitrale. Ce ventricule propulse ensuite ce sang dans l'aorte, puis dans l'ensemble du système de distribution artériel (grande circulation). Le retour du sang des organes irrigués se fait à partir des capillaires systémiques, par le réseau de drainage veineux. Le sang rejoint donc les veines caves puis l'oreillette droite et le cycle recommence. Le sang contenu dans les cavités cardiaques (ventricules et oreillettes) n'échange pas de nutriment avec l'endocarde. Comme tous les autres organes, le coeur reçoit son apport sanguin par des branches artérielles (les artères coronaires) qui naissent de l'aorte.



**Figure 1. Direction du débit sanguin dans le coeur (tiré de Vander *et al.*, 1989).**

## **1.2. Organisation du tissu cardiaque: les cardiomyocytes.**

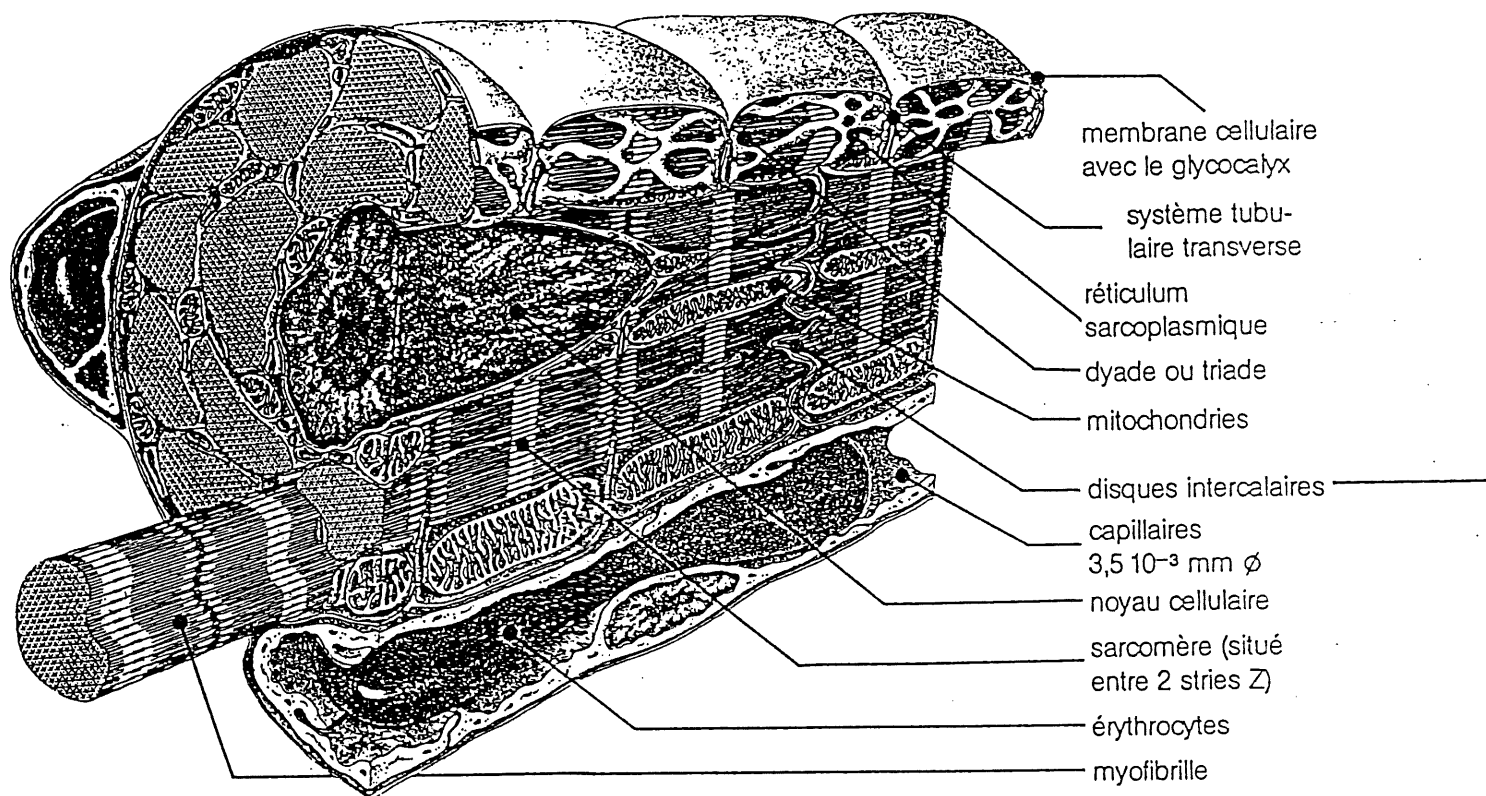
Les cellules du muscle cardiaque (cardiomyocytes) possèdent certaines propriétés du muscle lisse et certaines propriétés du muscle squelettique (figure 2). Ces cellules sont striées en raison de l'alignement des multiples sarcomères. Ces derniers contiennent des filaments épais de myosine et des filaments minces d'actine comme le muscle squelettique. Ces cellules ont plusieurs prolongements ramifiés et sont plus courtes ( $100\text{ }\mu\text{m} \times 20\text{ }\mu\text{m}$ ) que les fibres musculaires squelettiques. Elles sont liées entre elles bout à bout par les disques intercalaires. A cet endroit, il existe deux types de jonctions: les desmosomes et les jonctions à trous ("gap junction"). Des invaginations étroites et longues (les *caveole*) se prolongent en direction des vésicules du réticulum sarcoplasmique. Ces structures spéciales permettent d'augmenter la surface des faces latérales des cardiomyocytes.

Les propriétés fondamentales de ces cellules sont les suivantes: elles sont excitables, contractiles et conductrices. Certaines cellules du myocarde sont même douées d'automaticité et il en sera question un peu plus loin dans le texte.

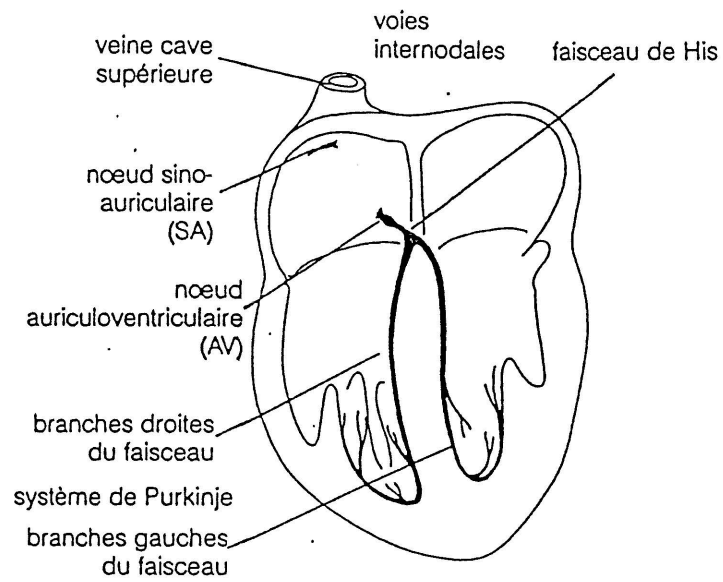
## **1.3. Les cellules cardionectrices.**

Le coeur contient des fibres musculaires spécialisées constituant un réseau dénommé "système de conduction" (figure 3). Ce réseau est en contact étroit avec les cellules myocardiques banales, par des jonctions à trous qui permettent le passage des potentiels d'action (Vander *et al.*, 1989). L'ensemble de ces cellules spécialisées est aussi désigné sous le nom de tissu nodal. Ce tissu s'occupe de gérer l'automatisme cardiaque et il comprend





**Figure 2. Organisation d'une cellule myocardique banale (tiré de Lossnitzer *et al.*, 1983).**



**Figure 3. Cellules cardionectrices et système de conduction dans le coeur (tiré de Vander *et al.*, 1989).**

les structures suivantes: le noeud sino-auriculaire (dit de Keith et Flack), le noeud auriculo-ventriculaire (dit d'Aschoff-Tawara) et le faisceau de His dont les branches forment le réseau de Purkinje. Le noeud sino-auriculaire est le "pacemaker" du coeur. Il bat environ à  $75 \pm 5$  pulsations par minute et il contrôle les centres sous-jacents en inhibant leur activité autonome latente. Le noeud auriculoventriculaire ralentit la propagation de l'influx venant des oreillettes. Les oreillettes et les ventricules sont séparés par un diaphragme fibreux. Le faisceau de His est le seul élément qui réunit fonctionnellement les fibres musculaires auriculaires et ventriculaires.

L'innervation que reçoit le coeur est constitué de fibres nerveuses sympathiques et parasympathiques. Les fibres sympathiques postganglionnaires se terminent sur les deux types de cellules du coeur, soit: les cellules myocardiques banales et les cellules cardionectrices dans les oreillettes et les ventricules. Les neurones parasympathiques innervent également ces deux types de cellules mais de façon beaucoup plus importante au niveau des oreillettes qu'au niveau des ventricules. Les fibres sympathiques postganglionnaires libèrent de la noradrénaline sur des récepteurs bêta-adrénergiques et les fibres parasympathiques libèrent de l'acétylcholine.

#### **1.4. Excitation et propagation de l'onde.**

Comme dans tous les différents types de muscles, la contraction du myocarde est déclenchée par la dépolarisation de la membrane plasmique. L'onde d'excitation prend naissance dans le noeud SA, puis se propage dans les oreillettes, d'une cellule à l'autre, grâce aux jonctions à trous. La propagation de l'onde se fait par

les cellules auriculaires ordinaires et également par des faisceaux de fibres spécialisées. Ceux-ci conduisent l'influx directement sur le noeud AV. La propagation des potentiels d'action à travers ce noeud nécessite environ 0,1 seconde, ce qui est relativement lent. Les oreillettes peuvent donc se contracter quelques temps avant les ventricules, ce qui permet d'ajouter une quantité supplémentaire de sang aux ventricules avant leur contraction. A partir du noeud AV, l'influx pénètre dans les ventricules par le faisceau de His. Deux branches se divisent de ce faisceau de chaque côté du coeur. Les ramifications de ces deux branches constituent les fibres de Purkinje. L'influx part donc de ces fibres et se propage dans les cellules myocardiques banales du reste des ventricules. Il en résulte une contraction coordonnée des cellules des ventricules droit et gauche. (Vander *et al.*, 1989).

La contraction des cellules du muscle cardiaque est causée par une augmentation de la concentration du calcium cytosolique. L'ouverture des canaux de calcium de la membrane crée un écoulement de calcium vers l'intérieur de la cellule. Ce calcium stimule la libération des réserves de calcium du réticulum sarcoplasmique. Une fois libéré, ce calcium se combine avec la troponine. Ceci a pour effet d'enlever l'inhibition, par la tropomyosine, de la formation de ponts entre l'actine et la myosine. A l'inverse du muscle squelettique, le calcium libéré dans le muscle cardiaque n'est pas suffisant pour saturer tous les sites de troponine. Ceci est très important car de cette façon, selon les besoins du coeur, le nombre de ponts actifs peut être soumis à des variations si le calcium du cytosol est augmenté.

### **1.5. Contrôles nerveux et hormonal de la fréquence cardiaque.**

Le noeud SA est placé sous l'influence constante de nerfs et d'hormones. Ainsi, la stimulation des nerfs parasympathiques (nerf vague) provoque un ralentissement du coeur et peut même entraîner son arrêt complet pendant un court laps de temps. L'influence parasympathique est dominante chez le sujet au repos. A l'opposé, la stimulation des nerfs sympathiques augmente la fréquence cardiaque.

L'acétylcholine, qui est un neurotransmetteur parasympathique, provoque une augmentation de la perméabilité de la membrane au potassium. Le seuil de dépolarisation est donc atteint plus lentement, ce qui entraîne une diminution de la fréquence cardiaque. La noradrénaline, qui est un neurotransmetteur sympathique, augmente l'arrivée des ions calcium dans les cellules nodales SA, ce qui provoque une augmentation de la vitesse de dépolarisation du pacemaker. En plus de ralentir le noeud SA, la stimulation parasympathique diminue la conduction dans le noeud AV. Quant à la stimulation sympathique, elle accélère le passage de l'excitation dans une bonne partie des voies de conduction spécialisées. Tout comme les nerfs cardiaques, les hormones peuvent aussi modifier la fréquence cardiaque. Par exemple l'adrénaline, qui est libérée par la medullosurénale, accélère le coeur en se fixant sur les mêmes récepteurs bêta-adrénergiques que la noradrénaline.

## 2. Rôles des nucléotides extracellulaires au niveau du coeur.

Depuis les observations de Drury et Szent-Györgyi (1929), il est devenu clair que l'adénosine et les composés qui lui sont apparentés jouent un rôle physiologique important dans le système cardiovasculaire, ce dernier étant dépendant du rôle biologique que ces composés jouent dans le métabolisme cellulaire. L'adénosine et l'ATP sont relâchés dans le milieu extracellulaire dans le coeur sous certaines conditions pathologiques et physiologiques qui sont caractérisées par une altération dans la disponibilité de l'oxygène. Dans l'espace extracellulaire, l'adénosine et l'ATP peuvent se lier à des récepteurs spécifiques à la surface des cellules. Ces effets s'exercent sur les vaisseaux sanguins coronaires (Hori et Kitakaze, 1991), sur les tissus spécialisés dans la génération de potentiel d'action (pacemaker) et dans la conduction du coeur (Belardinelli *et al.*, 1988), ainsi que sur les cellules contractiles myocardiales (Pelleg *et al.*, 1990). Même si l'ATP est connue pour exercer un effet prononcé dans le coeur des mammifères, le mécanisme de son action en général ainsi que les récepteurs spécifiques par lesquels son action est médiée ne sont pas complètement caractérisés.

L'hypoxie altère les fonctions métaboliques et physiologiques normales du myocarde. De plus, la libération de différents métabolites pouvant altérer l'apport de sang vers les cellules est un important phénomène associé à cette condition physiologique. L'adénosine triphosphate (ATP) est relâchée en grande quantité par les cardiomyocytes lorsque celles-ci sont placées en situation d'hypoxie (Forrester, 1990). Selon Williams and Forrester (1983), la source d'où provient l'ATP extracellulaire peut impliquer un complexe nucléotinique-protéinique- $\text{Ca}^{2+}$  localisé

dans le sarcolemme. Le manque d'oxygène semble être le stimulus impliqué lors des périodes de relâche massive d'ATP dans le milieu extracellulaire, à partir de cellules ventriculaires en situation d'hypoxie.

L'ATP extracellulaire, à concentration de l'ordre du millimolaire, provoque une augmentation momentanée de la concentration cellulaire en  $\text{Ca}^{2+}$  dans les cardiomyocytes (Zheng *et al.*, 1990). Un prétraitement avec la norépinéphrine potentialise cet effet de l'ATP sur le  $\text{Ca}^{2+}$  intracellulaire. C'est à partir des neurones sympathiques que l'ATP et la norépinéphrine sont relâchés.

## 2.1 Vasoactivité

Le coeur des mammifères est dépendant d'un apport d'oxygène qui doit être immédiat et suffisant pour la survie du myocarde. Les vaisseaux sanguins coronaires sont profondément affectés par certains produits du métabolisme qui agissent comme vasodilatateurs. La relâche d'ATP à partir des cellules endothéliales, des muscles lisses vasculaires, des cardiomyocytes et des érythrocytes suggère des sources multiples lorsqu'une préparation de coeur est placée sous hypoxie (Sévigny et Beaudoin, 1994). Le fait qu'une situation d'hypoxie induit une libération d'ATP à partir d'érythrocytes humains *in vitro* soulève une nouvelle spéculation concernant le contrôle du calibre des vaisseaux sanguins dans des conditions locales d'hypoxie. Selon Forrester (1990), l'effet vasodilatateur de l'ATP intravasculaire est dû à la stimulation qu'il effectue sur la libération du facteur de relaxation des cellules endothéliales (EDRF ou "Endothelium derived relaxing factor") de l'endothélium vasculaire. L'EDRF, de même que l'EDHF (endothelium derived hyperpolarising

factor) induisent une relaxation des muscles lisses en activant différentes voies métaboliques. Ainsi, l'EDRF induit une augmentation du GMP cyclique (GMPc) (Sévigny et Beaudoin, 1994). De plus, l'adénosine est considéré comme un puissant agent dilatateur dans les artères coronaires (Bern, 1980; Pelleg *et al.*, 1990; Balcells *et al.*, 1993).

D'autre part, l'effet de l'ATP peut être soit vasodilatateur ou vasoconstricteur au niveau des vaisseaux artériels, selon qu'il agit respectivement sur les cellules endothéliales ou sur les cellules musculaires lisses (Sévigny et Beaudoin, 1994).

## 2.2 Effets électrophysiologiques.

L'adénosine et l'ATP exercent tous les deux des effets électrophysiologiques prononcés sur le coeur des mammifères. Ces effets incluent l'effet chronotrope négatif sur le pacemaker (ralentissement des battements cardiaques) ainsi que l'effet dromotrope négatif (ralentissement ou blocage de la conduction) sur la conduction du noeud auriculo-ventriculaire (Belhassen et Pelleg, 1984; Pelleg *et al.*, 1990). L'ATP, l'ADP et l'adénosine induisent l'effet inotrope négatif (diminution de la force de contraction musculaire) dans les oreillettes de rat (Burnstock and Meghji, 1983). Des études *in vitro* et *in vivo* ont démontrées que l'adénosine induit une dépression de la potentialité de dépolarisation au niveau du noeud sino-auriculaire (SA) ainsi qu'au niveau du pacemaker et de la jonction ventriculaire. Pareillement, l'ATP induit une dépression de l'activité pacemaker et un ralentissement de la propagation de la conductivité ventriculaire.



L'effet électrophysiologique de l'adénosine varie selon l'espèce et le type de cellule (Belardinelli *et al.*, 1995). On sait depuis longtemps que l'action de l'adénosine sur le pacemaker supraventriculaire est médiée par un purinorécepteur de type A1 à la surface des cellules. La liaison de l'adénosine à ce récepteur induit une activation des canaux potassiques, entraînant ainsi l'augmentation en ions K<sup>+</sup> dans le milieu extracellulaire (K<sup>+</sup> outward current) et, par le fait même, l'hyperpolarisation de la membrane cellulaire (Belardinelli and Isenberg, 1983; Pelleg *et al.*, 1990). De ce point de vue, l'action de l'adénosine est similaire à celle de l'acétylcholine. En ce sens, il a été démontré que l'activation de ces récepteurs ou des récepteurs muscarinique-cholinergiques à l'adénosine, affecte les mêmes canaux K<sup>+</sup>. Cet effet semble être le plus important de l'adénosine et se retrouve chez toutes les espèces étudiées jusqu'à ce jour (Belardinelli *et al.*, 1995). Ceci pourrait expliquer l'interaction entre l'adénosine et l'influx nerveux du nerf vague dans le coeur (Fredholm *et al.*, 1982), observée *in vivo*, en regard des effets dépresseurs sur l'activité pacemaker du noeud SA. Indépendamment du type de cellule et de l'espèce, l'adénosine inhibe la dépolarisation de la membrane stimulée par des agonistes bêta-adrénergiques. L'action anti-bêta-adrénergique de l'adénosine semble être dépendante d'une réduction de la concentration intracellulaire de l'AMPC (Belardinelli *et al.*, 1995).

On connaît mal le mécanisme d'action de l'ATP qui produit un effet chronotrope négatif. Ce nucléotide est rapidement dégradé en ADP, AMP et adénosine, et c'est par cette transformation que l'ATP produirait un effet électrophysiologique (Hopkins, 1973; Willemot and Paton, 1981). Des évidences de ce mécanisme ont été trouvées *in vitro* et *in vivo*. On a suggéré que l'ATP interagirait avec les purinorécepteurs P<sub>1</sub> avant d'être transformé en adénosine (Collis and Pettinger, 1982). Cependant, chez le

chat, le chien et l'humain, l'ATP déclenche un réflexe vague qui joue un rôle majeur au niveau des actions électrophysiologiques. De plus, l'adénosine atténue la relâche de noradrénaline induite par la stimulation des nerfs adrénergiques via une action présynaptique. Certaines études ont révélées que l'adénosine peut inactiver l'action pacemaker des fibres de Purkinje chez le chien.

Au cours des dernières années, plusieurs études ont confirmé les observations de Drury et Szent-Györgyi, suite à l'étude de l'action de l'adénosine et des composés qui lui sont apparentés sur le noeud auriculo-ventriculaire. Cette action est caractérisée par un ralentissement de la conduction dans le noeud AV, ayant comme résultat une prolongation dans l'intervalle de temps entre l'électrogramme de l'oreillette droite et du faisceau de His, se terminant par un bloc auriculo-ventriculaire complet. Il est maintenant bien accepté que l'action dromotrope négative est médiée par un récepteur cellulaire de surface de type  $P_1$  ( $A_1$ ). Ainsi, il est concevable qu'un blocage au noeud auriculo-ventriculaire, observé lors d'essais cliniques sous conditions spécifiques et provoquant l'infarctus du myocarde, soit médié, en dernière analyse, par de l'adénosine endogène relâchée à partir de tissus ishémiques (Pelleg *et al.*, 1990).

L'action de L'ATP sur le noeud auriculo-ventriculaire s'explique par la conversion de celui-ci en adénosine. Chez le chien, l'action de l'ATP serait médiée également en partie, par les réflexes déclenchés au niveau du nerf vague, donc par une voie directe indépendante de la conversion de l'ATP en adénosine.

### 3. Les purinorécepteurs.

Contrairement au cerveau ou au tissu adipeux, les récepteurs de l'adénosine du coeur ont été difficiles à étudier à cause de la faible densité de ceux-ci. En 1978, Burnstock a proposé un système de base pour distinguer deux types principaux de purinorécepteurs; ce système étant basé en partie sur l'action des nucléotides et nucléosides dans une variété de tissus. Depuis ce temps, plusieurs expériences ont permis de confirmer et d'enrichir cette classification; notons entre autres les travaux de Van Calcar *et al.* (1978) et de Londos *et al.* (1980). La classification originelle divisait les purinorécepteurs en deux groupes, soit  $P_1$  et  $P_2$ , cette classification étant basée sur quatre critères: 1) la potentialité relative de l'ATP, de l'ADP, de l'AMP et de l'adénosine; 2) les actions sélectives des antagonistes, plus particulièrement les méthylxanthines (caféine); 3) l'activation de l'adénylate cyclase par l'adénosine mais non par l'ATP; 4) l'induction de la synthèse de prostaglandine par l'ATP mais non par l'adénosine. Ainsi, la classification suivante fut proposée: les purinorécepteurs  $P_1$  sont plus sensibles à l'adénosine et à l'AMP qu'à l'ATP et à l'ADP; les méthylxanthines tel que la téophylline et la caféine sont des antagonistes sélectivement compétitifs pour ces récepteurs  $P_1$ ; et l'occupation de ces récepteurs conduit à l'inhibition ou à l'activation d'un système adénylate cyclase avec comme résultat un changement dans le taux d'AMPc intracellulaire. Pour ce qui est des purinorécepteurs  $P_2$ , ceux-ci sont plus sensibles à l'ATP et à l'ADP qu'à l'AMP ou l'adénosine; les méthylxanthines ne sont pas des antagonistes de ces récepteurs et ils ne peuvent agir via un système adénylate cyclase; et leur occupation peut conduire à la synthèse de prostaglandines (Burnstock, 1990).

Par la suite, les purinorécepteurs  $P_1$  ont été subdivisés en récepteurs  $A_1$  et  $A_2$ , selon leur affinité, pour un analogue particulier de l'adénine. Les analogues suivants possèdent une affinité par ordre d'importance, pour les récepteurs  $A_1$ : L-N6-phenylisopropyladenosine (L-PIA) > N6-cyclohexyladenosine (CHA) > 2-chloroadenosine (CADO) > 5'-N-ethyl-carboxamidoadenosine (NECA) et D-PIA. Pour les récepteurs  $A_2$ , les analogues sont les suivants: NECA > CADO > L-PIA et CHA. Quant aux purinorécepteurs  $P_2$  ils ont été subdivisés en récepteurs  $P_{2x}$ ,  $P_{2y}$ , selon leur affinité pour certains analogues de l'ATP. Les analogues de l'ATP pour les récepteurs  $P_{2x}$  sont les suivants: alpha, bêta-méthylène ATP (alpha, bêta-meATP) > bêta,gamma-meATP > ATP > 2-méthylthio-ATP (2-ME-S-ATP). Les analogues de l'ATP pour les récepteurs  $P_{2y}$  sont: 2-Me-S-ATP > ATP > alpha,bêta-meATP et bêta,gamma-meATP. Les récepteurs à l'ATP présents sur les plaquettes sanguines et les mastocytes ne répondent pas à cette classification. Ils ont donc été respectivement dénommés  $P_{2z}$  et  $P_{2t}$  (Burnstock, 1990; Cusack, 1990).

Les deux types de récepteurs  $P_1$  et  $P_2$  ont été observés dans le coeur des vertébrés (Fleetwood et Gordon, 1987; Olsson et Pearson, 1990). Ainsi, un purinorécepteur de type  $P_2$  a été observé au niveau des cellules ventriculaires, ce purinorécepteur ayant des effets très nets sur l'équilibre du  $Ca^{2+}$  du myocarde (De Young et Scarpa, 1990). La présence de ce récepteur permet à l'ATP d'exercer son action sur la modulation momentanée du  $Ca^{2+}$  intracellulaire. Au niveau des vaisseaux, l'ATP induit une vasoconstriction via les purinorécepteurs  $P_{2x}$ , et une vasodilatation via les récepteurs  $P_{2y}$  (Hopwood et Burnstock, 1987).

#### 4. Les ectonucléotidases (ATPases, ADPases et 5'-nucléotidase).

Les systèmes biologiques comportent une organisation qui permet de contrôler et de moduler leurs composantes face aux fluctuations du milieu environnant. Dans le cas du coeur, les ectonucléotidases représentent un maillon important dans le contrôle des concentrations d'ATP, d'ADP, d'AMP et d'adénosine dans le milieu extracellulaire.

Parmi les activités ectonucléotidases décrites et localisées dans le coeur, on retrouve principalement les activités ATPasiques, ADPasiques et AMPasique ou 5'-nucléotidase. La 5'-nucleotidase a été identifiée pour la première fois dans le coeur par Leven and Medigrecena (1911). On croyait au début que cet enzyme n'était présente qu'à la surface de la membrane plasmique, étant donné que l'activité maximale de la 5'-nucléotidase, dans les perfusions du coeur de rat, était égale sinon supérieure à l'activité retrouvée dans l'homogénat de coeur (Frick et Lowenstein, 1976). Depuis, sa présence au niveau de la membrane plasmique ainsi que dans le cytosol a été mise en évidence par de nombreux auteurs; sa fonction étant essentiellement de transformer l'AMP en adénosine.

Plusieurs chercheurs ont travaillé sur l'activité ATPasique du coeur tel que McNamara *et al.* (1974), Malouf et Meissner (1980), Dhalla *et al.* (1981), Forrester et Williams (1977), Tuna et Dhalla, (1982;1988), Zhao *et al.* (1991), Zinchuk et Bulavka, (1991), Meghji *et al.* (1992) et bien d'autres encore. Selon Bowditch *et al.* (1985), l'ATP est rapidement hydrolysé dans le tampon de perfusion d'un coeur de rat. En effet, l'accumulation de phosphate inorganique lors de l'hydrolyse de l'ATP est 5 fois plus grande que le taux observé avec l'AMP. De plus, le taux d'hydrolyse des

triphospho-et diphosphonucléoside conduit à une accumulation d'AMP.

L'activité ATPasique décrite par ces auteurs est dépendante du  $\text{Ca}^{++}$  et du  $\text{Mg}^{++}$  et elle n'est pas due à la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase (pompe des ions  $\text{Na}^+$ ) ni à la "Ca $^{++}$  stimulated ATPase" (pompe des ions  $\text{Ca}^{++}$ ). Elle semble être localisée dans le sarcolemme, dans le réticulum sarcoplasmique, dans le système tubulaire transverse ainsi que dans les disques intercalaires incluant les jonctions intermédiaires et les desmosomes. Cette activité enzymatique a été retrouvée également à la surface des cellules endothéliales des capillaires.

Cependant, les investigations effectuées au niveau de l'activité ADPasique sont beaucoup plus rares. Ainsi, De Vente *et al.*, (1984), Bodwich *et al.* (1985) et Meghji *et al.* (1992) font partie des rares personnes qui ont identifié ce type d'activité dans le coeur. La confirmation, par Meghji *et al.*, de la présence d'activités ATP- et ADPasique à la surface des cellules cardiaques de rat, a amené ceux-ci à suspecter la présence d'une ATP-diphosphohydrolase.

## **5. Les ATP-diphosphohydrolases.**

Cette enzyme, également désignée sous le nom d'apyrase est responsable de l'hydrolyse séquentielle des résidus  $\gamma$  et  $\beta$  phosphates des triphospho- et des diphosphonucléosides pour produire le dérivé monophosphate. Elle a d'abord été trouvée sous forme soluble et membranaire, chez certaines plantes (Traverso-Cori *et al.*, 1965; Vara et Serrano, 1981; Kettlun *et al.*, 1982), puis par la suite chez des insectes et d'autres arthropodes

hématophages (Sarkis *et al.*, 1986), dont la sangsue médicinale, et chez le ver *Schistosoma mansoni* (Vasconcelos *et al.*, 1993). Chez ces animaux, on a attribué à l'enzyme une fonction anticoagulante. Chez les vertébrés, l'ATPDase a d'abord été retrouvée dans la membrane des grains de sécrétion des cellules acineuses du pancréas exocrine de porc (LeBel *et al.*, 1980; Laliberté *et al.*, 1982; Laliberté et Beaudoin, 1983). Bien qu'on ait réussi à la purifier et à définir ses propriétés cinétiques, on n'a pas réussi à lui assigner une fonction précise. Puis plus tard, cette enzyme a été identifiée chez plusieurs espèces et dans plusieurs organes (Knowles *et al.*, 1983): foie et cerveau de souris, glande mammaire, glande salivaire, utérus, myomètre, placenta et fraction synaptosomale du cerveau du rat, reins de chien et plusieurs lignées de cellules tumorales. On l'a aussi trouvée dans l'oviducte et le foie de poulet, la rate, les poumons, les cellules endothéliales et les muscles lisses de l'aorte ainsi que les muscles lisses de la trachée du boeuf. Enfin, l'ATPDase a été identifiée dans le cordon ombilical et le placenta humains (Beaudoin *et al.*, sous presse).

Au niveau du système circulatoire, elle a été retrouvée dans les vaisseaux coronaires et dans les cellules endothéliales de l'aorte (Miura *et al.*, 1987; Yagi *et al.*, 1989; Côté *et al.*, 1991).

L'ATP-diphosphohydrolase, par ses propriétés cinétiques ( $K_m$  de l'ordre du micromolaire, pH optimum de catalyse près de la neutralité, activation par les ions  $Ca^{++}$  et  $Mg^{++}$ ) de même que par la localisation extracellulaire de son site actif, serait en mesure d'intervenir efficacement *in vivo* en altérant les concentrations des nucléotides extracellulaires. Le fait que l'enzyme ait une haute affinité pour ses substrats lui permet d'intervenir à des concentrations de nucléotides de l'ordre de celles qui affectent les purinorécepteurs i.e. de 0,1 à 100 micromolaire.

Certaines études ont mis en évidence le rôle potentiel de cette enzyme dans la thromborégulation (Côté *et al.*, 1992; Marcus *et al.*, 1993). Ainsi, par exemple, l'ADP cause l'agrégation des plaquettes sanguines alors que l'AMP l'inhibe. De façon générale, l'ATPDase limiterait l'action des purinorécepteurs  $P_2$ , et/ou convertirait une action de type  $P_2$  en  $P_1$  (adénosine). L'ATPDase peut donc par ce moyen convertir une vasoconstriction en vasodilatation. Elle pourrait également influencer les actions du système nerveux et moduler les réponses de tous les systèmes qui subissent les assauts des nucléotides extracellulaires, quelle qu'en soit la source. Enfin, la possibilité de récupérer le groupement adénosine grâce à un transporteur spécifique pour les besoins du métabolisme cellulaire serait une conséquence importante de l'action combinée de l'ATPDase et de la 5'nucléotidase.

## **6. Hypothèse et objectifs.**

De façon globale, l'ATP est relâché dans le milieu extracellulaire et induit des effets physiologiques via la présence de purinorécepteurs à la surface des cellules cibles. En plus des purinorécepteurs, la membrane plasmique de ces cellules possède des ectoenzymes capables d'hydrolyser l'ATP extracellulaire en ADP, AMP et adénosine. La revue de littérature qui montre l'existence d'activités ATPasiques et ADPasiques au niveau des cardiomyocytes nous amène donc à formuler l'hypothèse suivante: ces activités sont imputables non pas à l'action combinée de deux enzymes distincts (soit une ATPase et une ADPase) mais plutôt attribuable à une ATP-diphosphohydrolase, cette enzyme ayant la capacité d'hydrolyser les groupements phosphates  $\gamma$  et  $\beta$  des triphospho- et des diphosphonucléosides. Ce qui n'exclut pas la présence d'autres ectonucléotidases. Nos objectifs sont donc dans un premier temps de purifier l'activité ADPasique dans le coeur et



dans un deuxième temps de caractériser la préparation enzymatique obtenue.

## CHAPITRE I

### MATÉRIEL ET MÉTHODES

#### 1. Matériel employé.

Les nucléotides, le triton X-100, le glycérol (1,2,3-propanetriol), le L-histidine, l'EDTA, le sodium déoxycholate, le tris base (tris(hydroxyméthyle)aminométhane), le Tétramisole, l'Hepes, l'imidazole, le molybdate d'ammonium, le NaCl, le sucrose (bêta-D-fructofuranosyl-alpha-D-pyranoside, le  $\text{NaHCO}_3$ , le PMSF (phényléméthylesulfonyle fluorure, le  $\text{NaN}_3$ , le gossypol (1,1',6,6',7,7'-hexahydroxy-3,3'-diméthyle-5,5'-bis(1-méthyléthyle) [2,2'-binaphthalène]-8,8'-dicarboxyaldéhyde), l' $\text{AP}_5\text{A}$  (diadénosine pentaphosphate), le vert de malachite et l'inhibiteur de la trypsine Soga ont été achetés chez Sigma Chemical Co. (St.Louis, MO, USA). Le  $\text{MgCl}_2$ , le  $\text{CaCl}_2$  et le Tween 20 (polyoxyéthylène [20] sorbitanmonolaurate) ont été achetés chez Fisher, Fair Lawn NJ, USA. La Ouabaïne (3-(6-déoxy-alpha-L-mannopyranosyl)oxyl-1,5,11a,14,19-pentahydroxycard-20(22)-enolide a été acheté chez Calbiochem, San Diego, CA, USA. Le Me- $\alpha$ -D-mannopyranoside a été acheté chez Boehringer-Mannheim, Laval, Québec, Canada. Le réactif Bradford, le BSA (albumine de sérum bovin), l'Affi-Gel bleu, DEAE Bio-Gel A agarose, SDS et le polyacrylamide ont été achetés chez Bio-Rad Laboratories, Mississauga, Ontario, Canada.

## 2. Purification.

### 2.1 Extraction

Nous avons appliqué une procédure de fractionnement utilisée par Côté *et al.* (1992) pour l'aorte et par Picher *et al.* (1994) pour la trachée. Les coeurs de boeuf ont été obtenus d'un abattoir local (Abattoir Giroux, Bromptonville, Québec, Canada). Les coeurs ont été prélevés quelques minutes après la mort de l'animal puis placés immédiatement sur la glace jusqu'à l'arrivée au laboratoire. Toutes les étapes suivantes se sont déroulés à une température de 4°C. Les oreillettes, l'endothélium, les vaisseaux coronaires et la couche externe du myocarde ont été excisés du ventricule. Des morceaux du ventricules furent pesés puis passés au hache-viande et homogénéisés (10%) à l'aide d'un polytron à vitesse moyenne dans le tampon d'homogénat (NaCl 95 mM + Tris-base 45 mM pH 7,6). L'homogénat a été filtré sur coton-fromage (3 épaisseurs) puis centrifugé à 600 g durant 15 minutes. On a obtenu ainsi le culot 1 (C1) et le surnageant 1 (S1). C1 a été jeté puis S1 a été filtré sur coton-fromage et centrifugé à 22000 g durant 1h30. On a obtenu ainsi le culot 2 (C2) et le surnageant 2 (S2). S2 a été jeté puis C2 fut resuspendu dans du NaHCO<sub>3</sub> 1 mM et PMSF 1 mM de manière à obtenir une concentration en protéines se situant entre 3 et 7 mg/ml pour l'étape suivante. Après cet ajustement, C2 fut déposé sur un coussin de sucrose 35% puis centrifugé à 100000g. Après 2h30 de centrifugation, la fraction enrichie en membranes plasmiques a été prélevé sur le coussin de sucrose. Cette fraction a été ensuite lavée 2 fois dans NaHCO<sub>3</sub> 1 mM et PMSF 0,1 mM (centrifugation à 100 000 g durant 45 minutes). Après deux lavages successifs, le culot a été dilué dans du NaHCO<sub>3</sub> 1 mM à raison de 3 mg/ml de protéine. Le tout fut ensuite congelé à -20°C

dans le glycérol 5% et utilisé pour les étapes de purification suivantes.

## **2.2 Solubilisation.**

Les membranes plasmiques ont été lavés au préalable avec du Tris-base 25 mM pH 8 et de l'EDTA 2 mM. La concentration des protéines a été ensuite ajustée à 1-2 mg/ml dans une solution contenant 0,3% triton X-100 et du Tris-base à une concentration finale de 25 mM et à pH 8. Après centrifugation à 100 000 g durant 1 h, les protéines solubilisées se sont retrouvées dans le surnageant.

## **2.3 Chromatographie sur colonne.**

### **2.3.1 Colonne échangeuse d'anions DEAE.**

Après solubilisation, environ 140 mg de protéines ont été déposées sur une colonne échangeuse d'anions (Sépharose DEAE) de 18 ml de matrice. La colonne a tout d'abord été réactivée avec du NaOH 0,01 N puis rincée avec de l'eau nanopure. Ensuite, la colonne a été équilibrée avec son tampon (tampon DEAE: Triton X-100 0,1%, glycérol 7,5%, Tris-base 15 mM pH 8). L'échantillon fut ensuite déposé sur la colonne à une vitesse n'excédant pas 30 ml/h. L'élution fut faite par application d'un gradient de NaCl (0 à 0,13 M) dans le tampon DEAE décrit ci-haut. Les fractions riches en activité ADPasique furent réunies puis soumises à trois dialyses consécutives de 4 heures chacune contre 4 litres d'une solution de Tris-base 1 mM pH 8 avec Triton X-100 0,03% à une température de 4°C pour diminuer la concentration de NaCl à moins de 0,01 M.

### 2.3.2 Colonne d'affinité Affi-Gel Bleu.

Les fractions actives recueillies sur la colonne DEAE et dialysées ont été déposées sur une colonne d'affinité pour les sites de liaison à l'ATP: l'Affi-Gel Bleu. Cette colonne possédait 6 ml de matrice. La colonne a d'abord été traitée par des lavages successifs avec le tampon de lavage à pH 8,5 (NaCl 1 M + tris-base 0,1 M + 0,1% Triton X-100), de l'eau nanopure puis le tampon de lavage pH 4,5 (NaCl 0,5 M + Acétate de sodium 0,1 M) + 0,1% Triton X-100. L'échantillon (environ 8,1 mg de protéines) fut ajusté à 30 mM de tampon tris-base pH 8,0 puis ensuite le pH fut ajusté à 5,9 avec 200 mM de L-histidine à pH 4,0. L'échantillon a été déposé sur la colonne à une vitesse n'excédant pas 25 ml/h. L'enzyme fut éluée par deux gradients successifs. Le premier gradient était composé de deux solutions. La solution "A" était appliquée en premier pour finir avec la solution "B". Voici la composition de ces deux solutions: Solution A: Tris-base 10 mM à pH 6,8 dans tampon de base (Triton X-100 0,75%, glycérol 7,5%, tris 0,5 mM pH 8); Solution B: Tris-base 10 mM à pH 7,5 dans le tampon de base + NaCl 1 M. Le deuxième gradient était aussi composé de deux solutions. La solution no. 1 était appliquée en premier pour finir avec la solution no. 2. Voici la composition de ces deux solutions: Solution 1: Tris-base 10 mM à pH 7,5 dans le tampon de base + NaCl 1 M.; Solution 2: tampon de lavage (NaCl 1 M + tris-base 0,1 M pH 7,5 + glycérol 7,5% + Triton X-100 0,075%).

### 2.3.3 Colonne d'affinité pour les sucres Concanavalline A

Les fractions récoltées sur la colonne Affi-Gel Bleu et riches en activités ADPasique ont été réunies puis équilibrées de la manière suivante. L'échantillon fut dilué pour abaisser la concentration de NaCl entre 500 mM et 100 mM. Du  $\text{CaCl}_2$  et du  $\text{MnCl}_2$  ont été ajoutés (solution mère: 1 M chacune) pour obtenir une concentration finale de 1 mM. La concentration du Triton X-100 fut ajustée à 0,05% à l'aide d'une solution mère de 10% et le pH fut ajusté à 6,8 avec 50 mM de PIPES pH 5,5. L'échantillon (environ 1,9 mg de protéines) fut ensuite déposé sur la colonne (2 ml de matrice) préalablement équilibrée avec le tampon de la colonne Con A-agarose (Triton X-100 0,05%, NaCl 100 mM,  $\text{CaCl}_2$  1 mM,  $\text{MnCl}_2$  1 mM, PIPES 20 mM à pH 6,8) à une vitesse maximale de 10 ml/h. On a élué avec 0,5 M de Me- $\alpha$ -D-mannopyranoside dans le tampon de la colonne Con A-agarose. Les fractions riches en activité ADPasique furent réunies puis soumises à trois dialyses consécutives de 4 heures chacune contre 4 litres d'une solution de Tris-base 1 mM pH 8 avec Triton X-100 0,03% à une température de 4°C pour diminuer la concentration de NaCl à moins de 0,01 M. La dernière étape de purification fut une concentration sur une mini-colonne DEAE (1,0 ml de matrice) selon la procédure décrite plus haut.

### 3. Dosage de l'activité enzymatique.

Le dosage de l'ATPDase a été réalisé selon la méthode du vert de malachite (Baykov *et al.*, 1988). L'activité de l'enzyme a été déterminée à 37°C dans un milieu d'incubation de 1 ml contenant du  $\text{CaCl}_2$  2 mM, du substrat (ATP ou ADP) 200  $\mu\text{M}$ , de l'Imidazole 50 mM, et du Tris-base 50 mM à pH 7,5. La réaction était arrêtée

après 15 minutes en ajoutant 0,25 ml du réactif de vert de malachite (Solution A: Molybdate d'ammonium 7,5%; Solution B: Vert de malachite 0,122% dans  $H_2SO_4$  6N; Solution C: Tween 20 11%; Réactif du vert de malachite: 2,5 ml Sol. A + 10 ml Sol B + 0,2 ml Sol. C). La concentration du Pi était ensuite mesurée au spectrophotomètre à 590 nm. Une unité d'activité ATPDase correspond à la relâche de 1  $\mu$ mol Pi/min à 37°C. L'activité spécifique correspond à des unités par milligramme (U/mg).

#### **4. Dosage des protéines.**

La concentration des protéines a été déterminée par la technique de Bradford sur microplaques (Bradford, 1976). Étant donné que le BSA (l'albumine de sérum bovin) a servi de standard, un facteur de correction (x 1,5) a été appliqué aux résultats.

#### **5. Gel d'électrophorèse (SDS PAGE)**

La procédure décrite ici est inspirée de Laemmli (1970). Environ 100  $\mu$ g de protéine ont été déposés dans chaque puit. Cinquante ml de tampon d'échantillon (30  $\mu$ l de mercaptoéthanol pour 1 ml de tampon d'échantillon concentré 3 fois (glycérol 10%; Tris-HCl 0,065 M pH 6,8; SDS 2%; bleu de bromophénole 0,0005%; mercaptoéthanol 1%)) ont été ajoutés à 100 ml d'échantillon puis bouillis durant 5 min. Le "gel séparateur" (gradient de 4% d'acrylamide à 7,5%) a tout d'abord été coulé entre deux plaques de verre puis après la polymérisation, le gel de concentration (0,5M Tris-HCl; SDS 4%; pH 6,8) a été déposé. La migration des échantillons dans le gel de concentration s'est effectuée en présence d'un courant de 10 mA. Après que les échantillons ont

atteint le gel de séparation, la migration s'est fait sous une différence de potentiel de 300 V (environ 50 mA). Après migration complète du bromophénol bleu dans le gel, la coloration a été faite soit au bleu de coomassie ou au nitrate d'argent (Merril, 1990).

## **6. Caractérisation de l'ATPDase.**

### **6.1. Courbe de pH.**

L'activité enzymatique de l'ATPDase a été évaluée dans les mêmes conditions qu'un dosage normal (voir chapitre 3, page 28) mais dont le pH du milieu d'incubation variait entre 6 et 9.

### **6.2. Effets des ions divalents ( $\text{Ca}^{2+}$ et $\text{Mg}^{2+}$ ).**

L'activité enzymatique de l'ATPDase a été évaluée selon les mêmes conditions standards (pH 7,5) en variant la concentration du  $\text{Ca}^{2+}$  et du  $\text{Mg}^{2+}$  de 0 et 10 mM. Pour chélater les ions divalents, l'EDTA a été utilisé à une concentration de 1 mM.

### **6.3. Électrophorèse en conditions non-dénaturantes.**

En conditions non-dénaturantes, l'électrophorèse en gel d'acrylamide sépare les protéines sous forme naturelle selon leur taille et leur charge. Cette procédure est celle utilisée par Côté *et al.* (1992).



#### Gel de séparation:

Deux solutions de polyacrylamide (4 et 7,5 % (p/v)) étaient coulées entre deux plaques de verre de manière à former un gradient linéaire. Les compositions des solutions étaient les suivantes:

4% acrylamide: 4,5 ml tampon de séparation (tris 1,5M pH 8,3)  
2,4 ml acrylamide 30%  
180 µl Na-déoxycholate 10%  
180 µl Triton X-100 10%  
Complété à 18 ml avec de l'eau  
Ajout de 60 µl APS + 7 µl TEMED

7,5% acrylamide : 4,5 ml tampon de séparation  
4,5 ml acrylamide 30%  
180 µl Na-déoxycholate 10%  
180 µl Triton X-100 10%  
Complété à 18 ml avec de l'eau  
Ajout de 60 µl APS + 7 µl TEMED

Pour une meilleure qualité de gel, il est possible de filtrer et de dégazer le mélange (avant d'ajouter le TEMED et l'APS). Il est important que le TEMED et l'APS soient ajoutés à la dernière minute lorsque le gel est prêt à être coulé pour initier la polymérisation.

#### Gel de concentration:

Le gel de concentration était préparé 1 à 4h avant la migration du gel. Sa composition était la suivante:

2,5 ml de tampon de concentration (tris-HCl 0,5M; pH 6,8)  
5,9 ml d'eau  
1,34 ml d'acrylamide  
0,1 ml Na-déoxycholate 10%  
0,1 ml Triton X-100 10%  
50 µl APS 10%  
10 µl TEMED

Préparation de l'échantillon:

L'échantillon protéique était solubilisé dans le tampon d'échantillon dont la composition était la suivante:

- triton X-100 0,7% (v/v)
- Na-déoxycholate 1,5% (p/v)
- 10 % glycérol
- Tris-base 65 mM, pH 6,8
- 0,001% bromophénol bleu.

Sauf indication contraire, 100 µg de protéines étaient solubilisées dans le triton et le déoxycholate de sodium puis ajoutés au tampon pour obtenir la concentration finale des produits nommés ci-haut.

La suspension était refroidie durant 10 min sur la glace, centrifugée et déposée dans les puits du gel. Les puits contenaient le tampon d'échantillon. La migration à travers le gel de séparation était réalisée à 4°C sous un courant de 10 mA dans un bac contenant le tampon de réservoir. Après passage dans le gel de concentration, le voltage appliqué était augmenté sans dépasser 200 V.

Tampon du réservoir: Solution mère --->concentrée 5x

Le tampon du réservoir était ajusté à 1x puis 2 grammes de déoxycholate de sodium par 2 litres de tampon étaient ajoutés (concentration finale 0,1%).

La composition de ce tampon était la suivante:

- Tris-base 25 mM, pH 8,3
- glycérine 240 mM
- Triton X-100 0,1%
- Na-déoxycholate 0,1% (p/v)

Revélation de l'activité:

Après migration complète, le gel était lavé à l'eau distillée et découpé en bandes et ensuite placé dans un tampon de détection (tris-base 66,7 mM, Imidazole 66,7 mM,  $\text{CaCl}_2$  10 mM à pH 7,5). Après acclimatation à 37°C durant 2 min, on remplaçait par du tampon frais équilibré à 37°C, puis on ajoutait le substrat (ADP, ATP) à une concentration de 4 mM. Après un certain temps (1-6 heures), un précipité de phosphate de calcium blanc s'était formé au site où se trouvait l'enzyme.

#### **6.4. Courbe de dénaturation par la chaleur.**

La courbe de dénaturation par la chaleur permet de comparer l'influence de la chaleur sur l'activité enzymatique avec ATP et ADP comme substrats. L'enzyme était d'abord placée à une température entre 0 et 70°C durant exactement 3 min puis refroidie sur glace. Son activité était ensuite dosée selon les conditions décrites plus haut à 37°C. Deux courbes ont été obtenues avec ATP et ADP comme substrats. La comparaison des courbes donne une indication sur l'identité des enzymes impliquées.

#### **6.5. Spécificité de substrats.**

Par définition, une ATPDase hydrolyse efficacement les triphospho-et diphosphonucléosides tandis qu'elle n'hydrolyse pas les nucléosides monophosphates. Le dosage de cet enzyme en présence de différents nucléosides a été réalisé selon la méthode de dosage décrite plus haut. Les nucléosides utilisés étaient: ATP, ITP, GTP, CTP, UTP, ADP, UDP, CDP, AMP, GMP, et UMP. De plus, l'activité a été mesurée avec la combinaison d'ATP et d'ADP.

Si effectivement un même site catalytique était responsable de l'hydrolyse de ces deux substrats, l'effet attendu n'aurait pas été additif.

#### **6.6. Effets de certains inhibiteurs.**

Les inhibiteurs testés étaient les suivants: l'Ap<sub>5</sub>A (0,1 mM) (inhibiteur de l'adénylate kinase) (Plesner, 1995), la Ouabaïne (3,0 mM) (inhibiteur de la Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup> ATPase) (Plesner, 1995), le gossypol (0,035 mM) (Dhalla et Zhao, 1988) et le NaN<sub>3</sub> (10 mM) (Dhalla et Zhao, 1988; Picher *et al.*, 1993). Les deux derniers sont reconnus comme inhibiteurs d'ATPDase.

#### **6.7. Western blot.**

Un échantillon provenant de la fraction purifiée de la colonne Con A-agarose a été séparé par gel d'électrophorèse SDS-PAGE puis transféré sur une feuille "Immobilion-P" tel que décrit par Towbin *et al.*, (1979). La membrane était colorée au Ponceau S (Millipore Corp., Bedford, MA, USA) tel que décrit par Schaffner et Weissman (1973). Pour l'immunolocalisation, les sites non-spécifiques étaient d'abord bloqués en incubant avec de l'albumine à 1% puis après des lavages répétés on a incubé la membrane avec l'anticorps primaire (anti-ATPDase type I) durant 2 heures. Après des lavages successifs, la membrane est incubée 1 heure et demie avec l'anticorps secondaire (anti-lapin conjugué à la phosphatase alcaline). Les anticorps ont été détectés selon la méthode décrite par Harlow et Lane (1988).

## 6.8. Immunohistochimie.

Le tissu du myocarde fraîchement prélevé a été fixé durant 24 h dans la paraformaldéhyde à 2%, le glutaraldéhyde à 0,17% dans un tampon sodium cacodylate 0,1 M à pH 7,4 contenant 4% de sucrose. Le tissu était ensuite déshydraté dans des solutions contenant des concentrations croissantes d'éthanol puis enrobés dans la paraffine. Des coupes de 4  $\mu$ m d'épaisseur ont été réalisées au microtome (Superfrost Plus Fisher). Les sections ont été ensuite déparaffinées avec du xylène et réhydratées avec une solution Tris-Saline 0,1 M (TSB). Après traitement à la formaldéhyde 0,2 M durant 10 min et lavages à l'eau et TBS, les sections étaient immergées dans une solution contenant du Triton X-100, de la saponine 0,1% et TBS pendant 15 min. Après un rinçage dans le TBS, les sections étaient traitées à la protéinase K (10  $\mu$ g/ml) durant 20 min à température de la pièce. Un nouveau rinçage au TBS puis les sections étaient traitées à l'acide acétique 20% durant 15 minutes et rincées dans une solution de TBS contenant de la glycine 0,1 M. Les sites non-spécifiques étaient ensuite bloqués par incubation dans du BSA 1% et de la poudre de lait 1% sans gras (avec TBS) durant 30 minutes à la température de la pièce.

Les sections étaient incubées durant 24 h à 4°C avec l'antisérum ATPDase type I ou du sérum pré-immune (1:100) pour les témoins, rincées au TBS puis incubées avec la phosphatase alcaline conjuguée à l'anticorps secondaire (Sigma, St.Louis, Missouri) (1:100) durant 120 min à température de la pièce. Après quelques lavages, la réaction était visualisée en utilisant le chlorure de tétrazolium nitrobleu et le 5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate comme substrats. Finalement, les sections étaient montées sur lames dans une solution de gélatine 5%, glycérol 27% et azide de

sodium 0,1% chauffé à 45°C avant le montage. L'observation se fait en microscopie électronique.

## **CHAPITRE II**

### **RÉSULTATS**

#### **1. Purification**

##### **1.1. Extraction de la fraction particulaire**

La première étape de purification consistait à obtenir une fraction enrichie en membranes plasmiques tout en ayant soin d'écarter de la préparation les constituants cytosoliques des cellules (noyaux, cytosol, organelles etc....). Le tableau 1 montre l'activité spécifique de l'ATPDase des cardiomyocytes ainsi que son facteur de purification à partir de l'homogénat jusqu'à la fraction particulaire enrichie en membranes plasmiques. L'activité de l'enzyme a été dosée avec l'ATP et l'ADP comme substrats. A l'étape du coussin de sucrose, on remarque un facteur de purification de 9,6 fois pour l'activité ADPasique et un facteur de purification de 3,3 fois pour l'activité ATPasique. On remarque qu'à cette étape, environ 77% de l'activité ATPasique est manquante. La différence observée entre les activités ATPasiques et ADPasiques s'explique par la perte de d'autres ATPases durant la purification (S2 et C1). On peut observer que dans la fraction particulaire, l'activité spécifique ATPasique est environ deux fois plus élevée que l'activité ADPasique.

**Tableau 1. Bilan de l'isolation de la fraction particulaire  
du ventricule de boeuf.\***

Fraction F.P.	Substrat	Protéine (mg)	Act. Tot. (umol/Pi/min)	Act. Spéc. (U/mg)	Act. Spéc. (%)	Ren.
H	ADP	9203	69	0,0076	100	0
	ATP	9203	486	0,0528	100	0
C1	ADP	3902	18	0,0047	26	0,6
	ATP	3902	229	0,0586	47	1,0
S1	ADP	5355	24	0,0044	35	0,6
	ATP	5355	262	0,0489	54	0,9
S2	ADP	4775	46	0,0096	67	1,3
	ATP	4775	106	0,0221	22	0,3
C2	ADP	1014	13	0,0130	19	1,7
	ATP	1014	215	0,2117	44	4
Coussin sucrose	ADP	165	12	0,0727	17	9,6
	ATP	165	29	0,1751	6	3,3

\* Expérience effectuée trois fois (en triplicata chaque fois).

(Légende: H: Homogénat; C: Culot; S: Surnageant; Act.tot: Activité totale;  
Act. Spéc.: Activité Spécifique; Ren.: Rendement; F.P.: Facteur de  
Purification.)

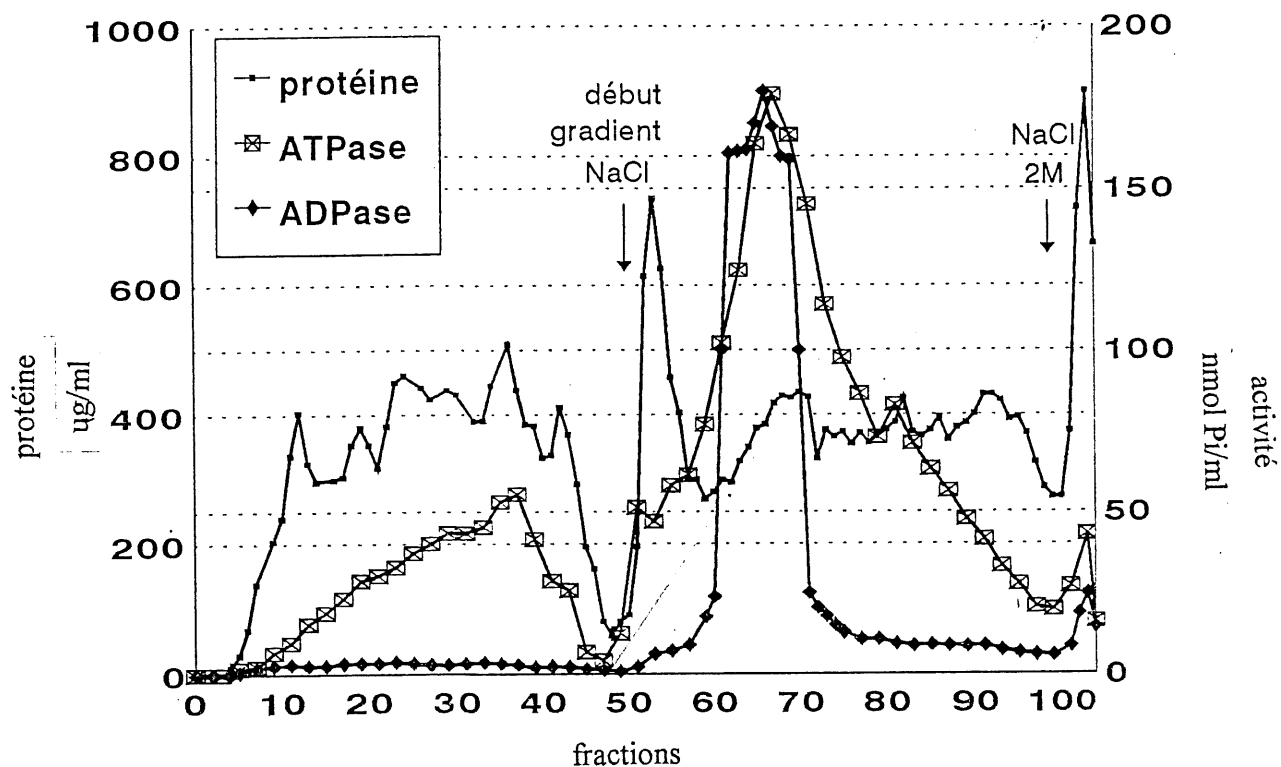


## **1.2. Solubilisation**

Afin de poursuivre la purification de l'enzyme par chromatographie sur colonne, il était essentiel de solubiliser l'activité enzymatique. Le détergent qui a été utilisé est le Triton X-100. Ce détergent a été choisi pour deux raisons: il est relativement peu coûteux et il a déjà été utilisé lors de purifications d'autres ATPDase dans notre laboratoire, par exemple l'ATPDase de l'aorte. Toutefois, la solubilisation diminue l'activité spécifique de 50%.

## **1.3. Colonne échangeuse d'ions DEAE**

Après solubilisation, le fractionnement a été réalisé avec une première colonne qui était une DEAE-sépharose échangeuse d'anions. Cette colonne sépare les protéines selon leur charge. La figure 4 correspond au profil d'élution de cette colonne. Le profil d'élution se compose de plusieurs pics de protéines, de même que de plusieurs pics d'activité ATPasiques et d'un pic majeur d'activité ADPasique. Les fractions 1 à 50 correspondent au volume de lavage des protéines non retenues par la colonne. L'élution à l'aide d'un gradient de NaCl débute à la fraction 51. Entre les fractions 1 et 50, une grande quantité de protéines est éliminée, de même qu'un pic d'activité ATPasique. Un pic très fin de protéines situé dans les fractions 50 à 60 est également éliminé de la préparation. Les fractions 60 à 70 sont celles qui sont les plus riches en activité ADPasique. De plus, ce pic correspond également à un pic d'activité ATPasique. Ces deux pics ont été élués à une concentration de 0,5 M. C'est donc les fractions de ce pic qui ont été réunies pour l'étape de purification suivante et ensuite déposées sur la colonne Affi-Gel Bleu.



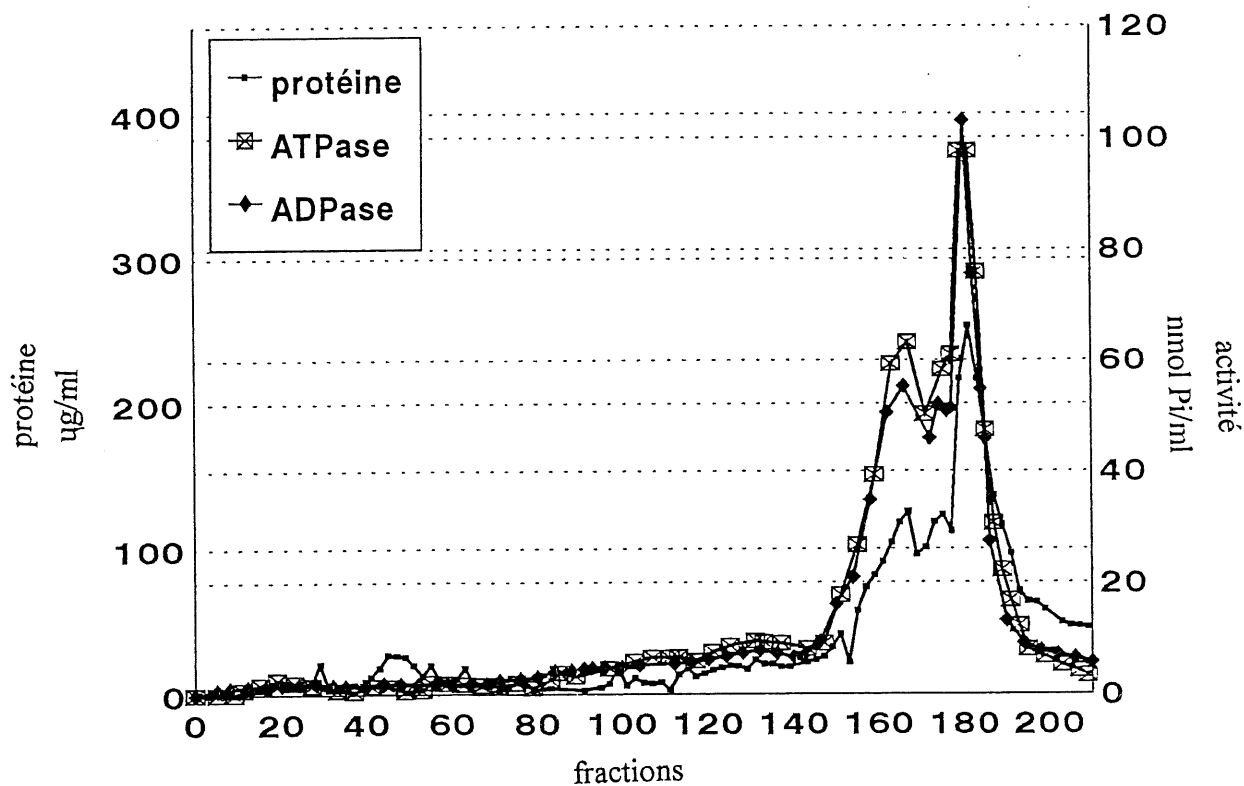
**Figure 4. Profil d'élution des protéines et des activités ATPasique et ADPasique de la colonne échangeuse d'ions DEAE. (L'activité spécifique ADPasique de l'échantillon déposé sur la colonne est de 0,016 U/mg)**

#### **1.4. Colonne Affi-Gel Bleu**

La figure 5 correspond au profil d'élution de la colonne Affi-Gel Bleu. Celle-ci est une colonne d'affinité pour les protéines possédant un site de liaison à l'ATP. Les fractions comprises entre 0 et 21 correspondent au volume d'élution des protéines non retenues par la colonne. Le premier gradient d'élution débute à la fraction 22. Le deuxième gradient d'élution débute à la fraction 80. Quelques protéines sans activité ADPasique sont éluées par le premier gradient. Dans le deuxième gradient, les deux pics d'activité ATPasique suivent parfaitement les deux pics de l'activité ADPasique. Le pic des fractions 150 à 170 est riche en activités ATPasique et ADPasique. C'est donc les fractions de ce pic qui ont été réunies pour l'étape de purification suivante. L'élution des échantillons a été faite comme s'il s'agissait d'une colonne échangeuse d'ions.

#### **1.5. Bilan de purification**

La dernière colonne utilisée a été une colonne d'affinité pour les sucres: la Concanavalline A-sepharose. Celle-ci possède la capacité de lier toutes les glycoprotéines. Comme il est indiqué dans le tableau 2, le passage de l'échantillon sur cette colonne a

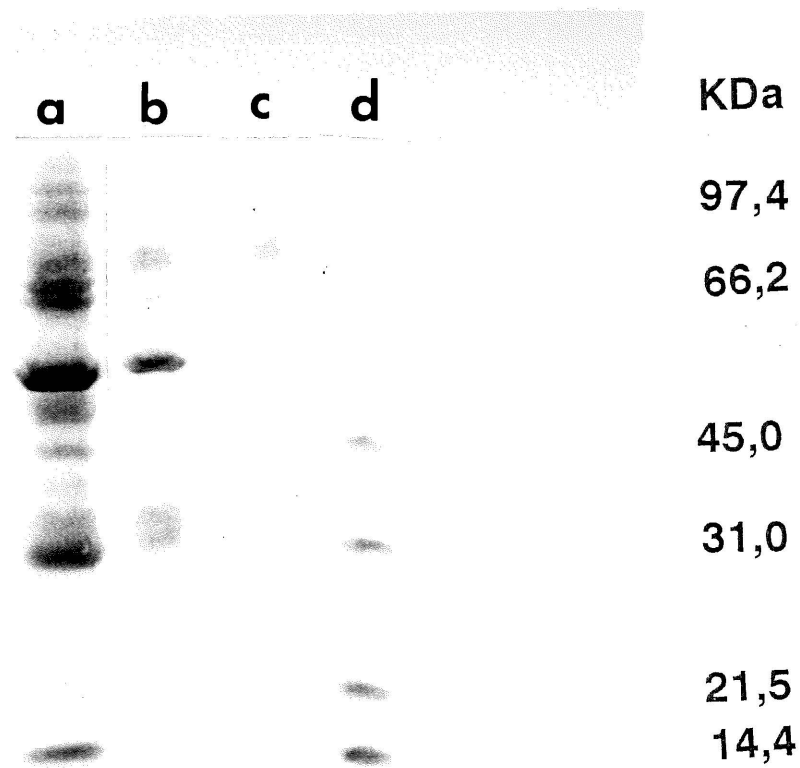


**Figure 5. Profil d'élution des protéines et des activités ATPasique et ADPasique de la colonne Affi-Gel Bleu.** (L'activité spécifique ADPasique de l'échantillon déposé sur la colonne est de 0,119 U/mg)

**Tableau 2. Bilan de purification de l'ATPDase du ventricule de boeuf.\***

Étape	protéine (mg)	Act. Tot. ( $\mu\text{mol}/\text{Pi}/\text{min}$ )	Act. Spec. (U/mg)	Ren. (%)	Fac.P.	taux d'hydrolyse (ATP/ADP)
f. p.	200	6,4	0,032	-	[10]	2
triton + f.p	200	2,6	0,012	100	1	1,5
surnagent de la f.p.	140	2,3	0,016	88	0,75	1,5
DEAE	8,1	0,97	0,119	37	9,9	1,1
Affi-gel bleu	1,92	0,63	0,326	24	27	1,1
Con A	0,30	0,47	1,551	18	129	1,1

\*Expérience effectuée trois fois (en triplicata chaque fois). avec l'ADP comme substrat. (Légende: f.p.: fraction particulière; Act. Tot.: Activité Total; Act. Spéc.: Activité Spécifique; Fac.P.: Facteur de Purification)



**a) Fraction particulière**

**b) Colonne DEAE**

**c) Colonne ConA**

**d) Standard**

**Figure 6. Séparation des protéines par SDS-PAGE à différentes étapes de purification.**

permis d'augmenter l'activité spécifique ATPDasique 5 fois, si on compare aux fractions purifiées sur la colonne d'Affi-Gel Bleu. En parallèle avec la figure 6, le tableau 2 permet de suivre l'évolution de la pureté de la préparation de l'enzyme. On remarque qu'au stade de la fraction particulaire, l'enzyme est déjà purifiée 10 fois. La solubilisation de l'enzyme résulte en une inactivation d'environ 50% et pour cette raison, le facteur de purification est arbitrairement ajusté à 1. Le facteur de purification entre l'étape de la solubilisation et celle de la colonne Con A est 129. Cependant, ce facteur doit être multiplié par 10 car l'enzyme a déjà été purifiée par un facteur de 10, entre l'étape de l'homogénat et celle de la fraction particulaire. L'activité spécifique finale est de 1,55 U/mg. La figure 6 montre le profil de migration des protéines séparées par SDS-PAGE à différentes étapes: fraction particulaire, colonne DEAE et colonne Con A.

## **2. Caractérisation biochimique**

Nous décrivons dans cette section les propriétés biochimiques de l'enzyme obtenue à la toute fin de la procédure de purification.

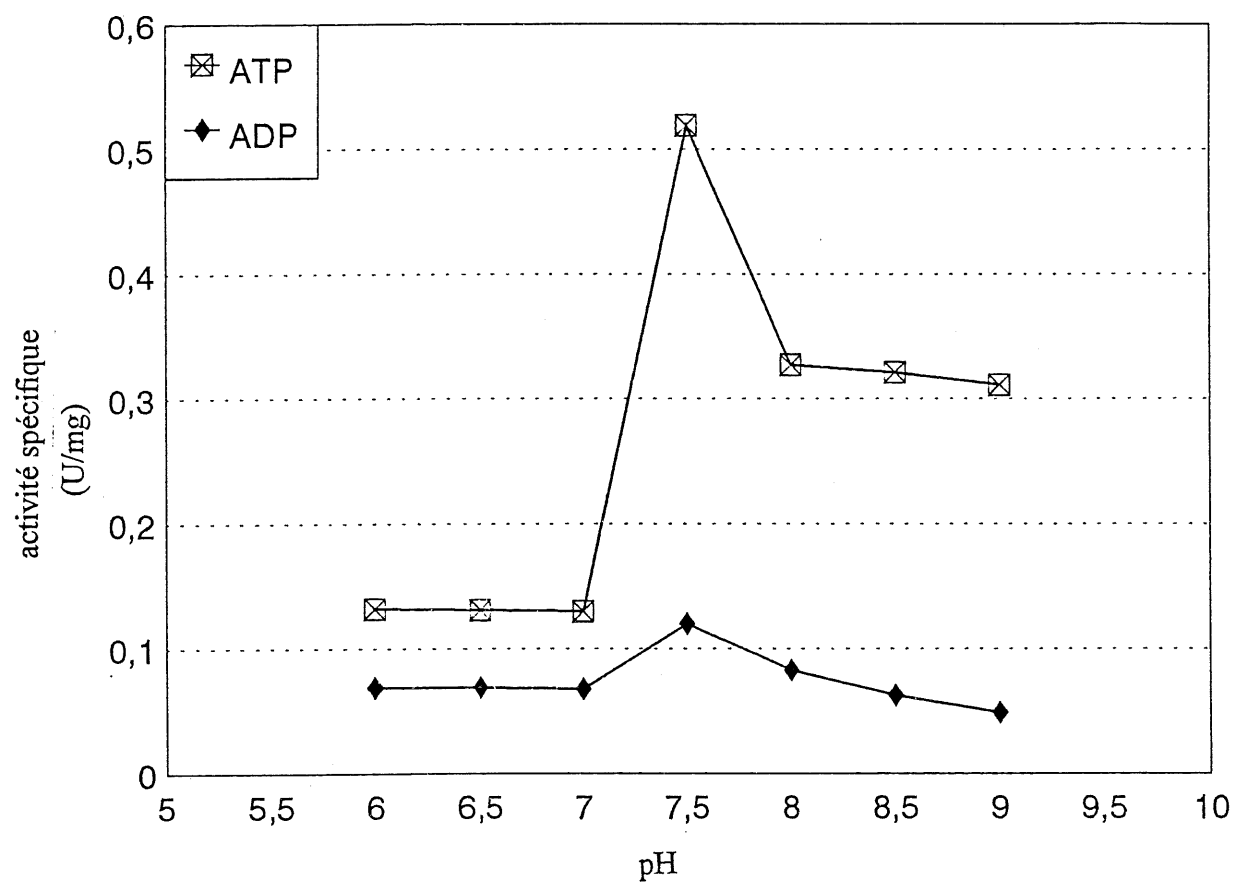
## **2.1. pH optimum**

L'influence du pH sur la vitesse de catalyse enzymatique a été évaluée avec ATP et ADP comme substrats. Comme il est montré à la figure 7, un pH optimum a été obtenu autour de 7,5 pour les deux substrats de l'enzyme (ATP et ADP). Cette enzyme est capable de fonctionner adéquatement à un pH physiologique.

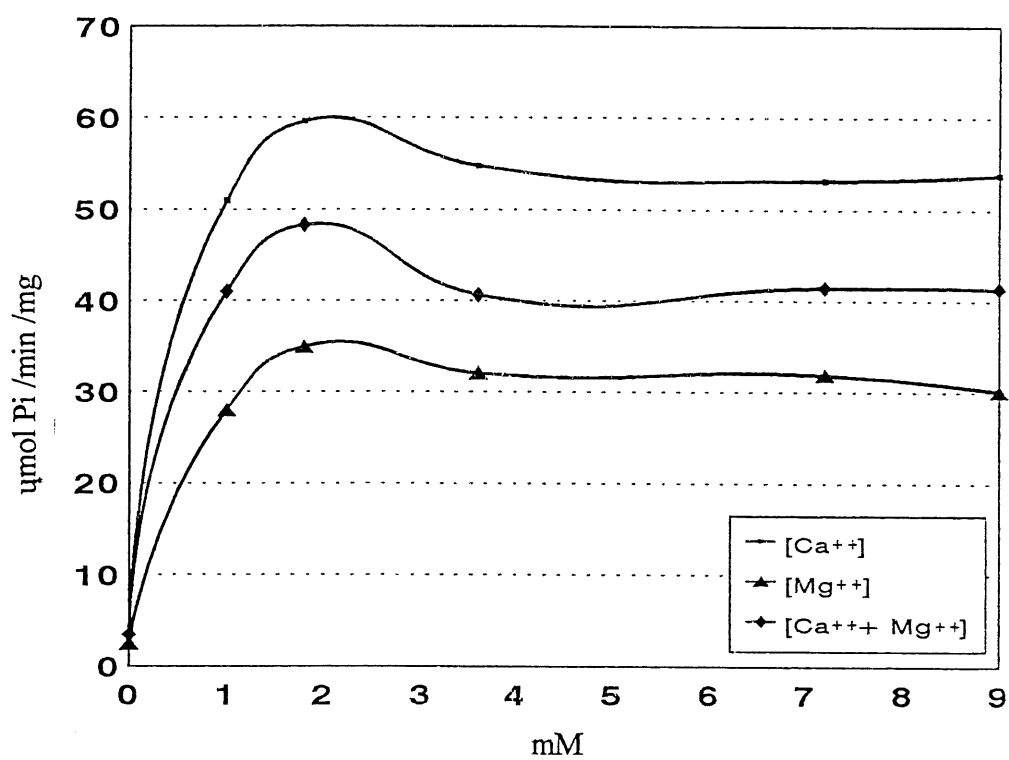
## **2.2. Besoins en ions divalents ( $\text{Ca}^{++}$ et $\text{Mg}^{++}$ )**

Les besoins en ions divalents de l'ATPDase ont été vérifiés. Comme on peut le voir sur la figure 8, l'enzyme est activée par la présence de  $\text{Ca}^{++}$  et de  $\text{Mg}^{++}$ . Le meilleur résultat est obtenu lorsqu'une concentration de 2 mM de calcium est présente dans le milieu de dosage. Le magnésium produit une stimulation inférieure de l'activité. De plus, il semblerait qu'il y ait compétition entre ces deux cofacteurs lorsqu'ils sont présents en même temps dans le milieu de dosage. Ce fait est illustré à la figure 8 par la courbe du milieu. Ainsi, lorsque les deux cofacteurs sont présents, l'activité de l'enzyme est supérieure à celle observée lorsqu'elle est en présence de magnésium seulement, tandis qu'elle est inférieure à celle observée lorsqu'elle est en présence de calcium seulement. Ceci indique clairement qu'il y a compétition entre ces deux éléments.





**Figure 7. Influence du pH sur l'activité de l'ATPDase.**  
(Expérience effectuée trois fois (en triplicata chaque fois))



**Figure 8.** Influence des ions  $\text{Ca}^{++}$  et  $\text{Mg}^{++}$  sur l'activité de l'ATPDase. (Expérience effectuée trois fois (en triplicata chaque fois))

### 2.3. $K_m$ et $V_{max}$

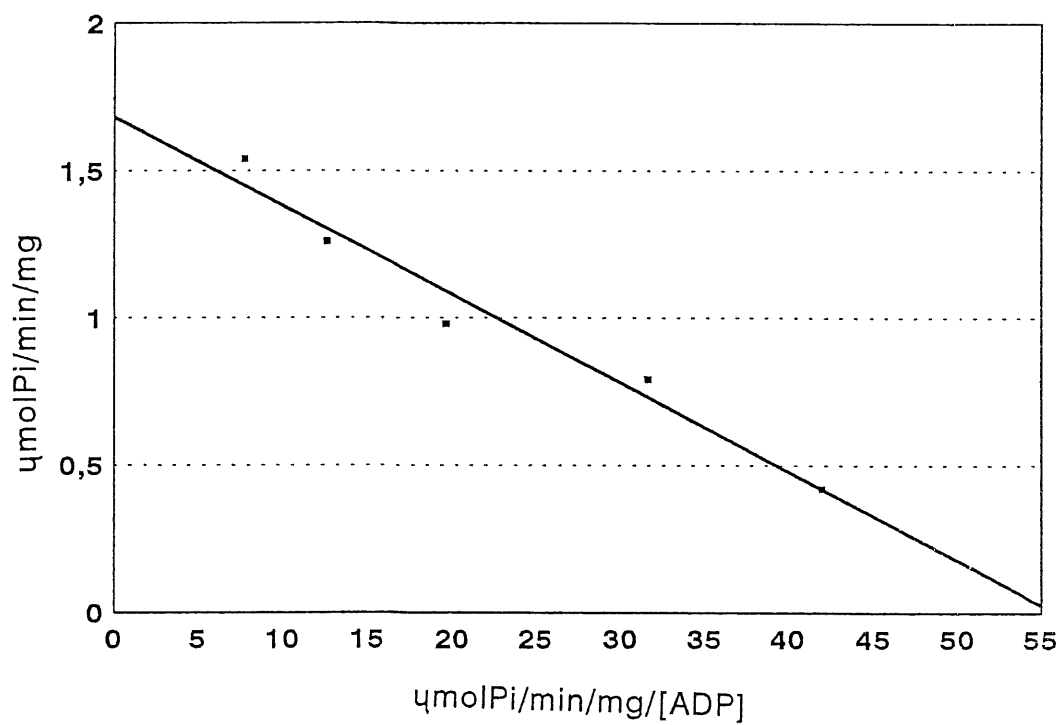
Le  $K_m$  et le  $V_{max}$  de l'enzyme ont été évalués avec l'ADP comme substrat. La figure 9 est une représentation graphique de Hofstee, qui est en fait une inversion du graphique de Eadie. Le graphique de Hofstee permet une détermination du  $K_m$  et du  $V_{max}$  beaucoup plus précise que d'autres types de graphiques du même genre, comme par exemple le graphique de Lineweaver-Burk. A l'aide de ce graphique, il a été possible de calculer le  $K_m$  de l'enzyme, celui-ci correspondant à la pente de la courbe. Le  $K_m$  de l'ATPDase du coeur de boeuf est d'environ 29  $\mu M$ , tandis que son  $V_{max}$  est de 1,66  $\mu mol$  Pi/min/mg.

### 2.4. Électrophorèse en conditions non-dénaturantes.

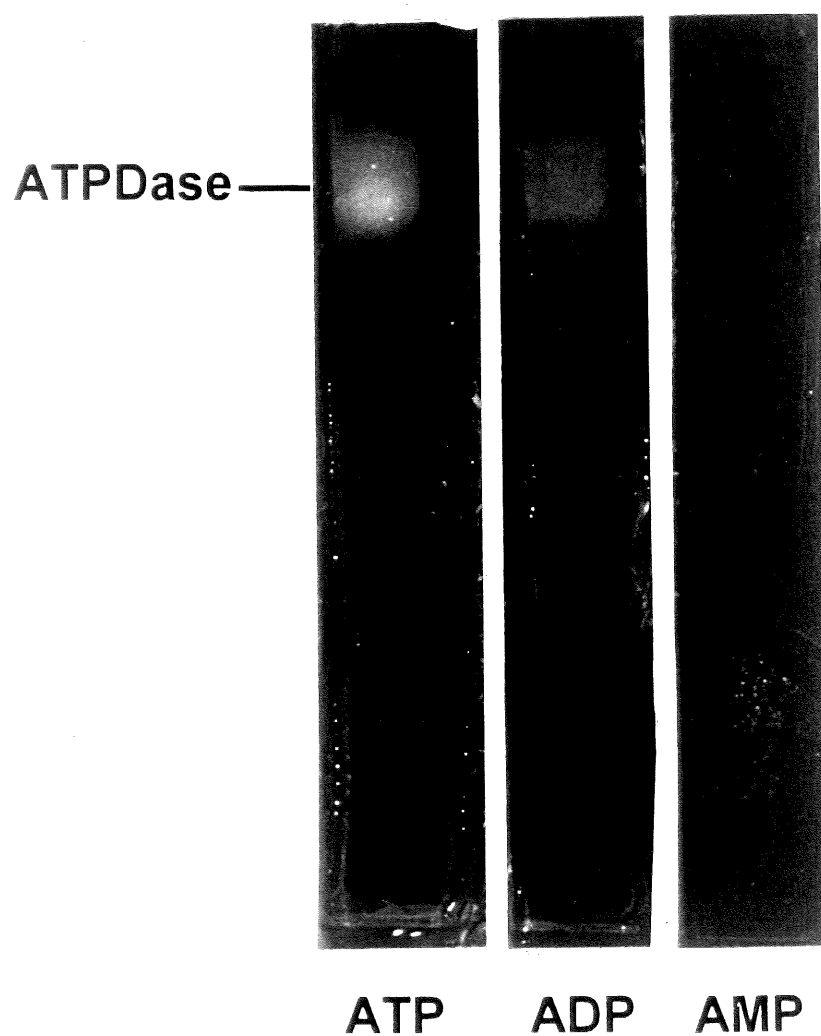
La figure 10 représente la migration de l'enzyme après électrophorèse en gel d'acrylamide dans des conditions permettant de conserver l'activité de l'enzyme. Comme il est possible de l'observer, la bande d'activité de l'enzyme, lorsque celle-ci hydrolyse de l'ATP, est à la même hauteur que la bande d'activité correspondant à l'hydrolyse de l'ADP. On peut noter qu'il n'y a pas d'hydrolyse détectable lorsque l'AMP est utilisé comme substrat, ce qui exclut la présence d'une phosphatase non-spécifique dans la préparation enzymatique.

### 2.5. Inhibiteurs

Quatres types d'inhibiteurs ont été testés sur l'enzyme. L'utilisation d'inhibiteurs spécifiques permet de mettre en évidence la présence ou l'absence de certaines enzymes. Le tableau 3 décrit les résultats obtenus. L'Ap<sub>5</sub>A est un inhibiteur



**Figure 9. Courbe d'Hofstee de l'ATPDase du ventricule de boeuf.**



**Figure 10. Profil de migration de l'ATPDase native sous PAGE en conditions non-dénaturantes.**

**Tableau 3. Influence de certains inhibiteurs sur l'activité de l'ATPDase.\***

Inhibiteur	Concentration	Inhibition (%)	
		ATP	ADP
Ap <sub>5</sub> A	0,1 mM	0	0
Ouabaïne	3,0 mM	0	0
Gossypol	0,035 mM	62	27
NaN <sub>3</sub>	10 mM	34	44

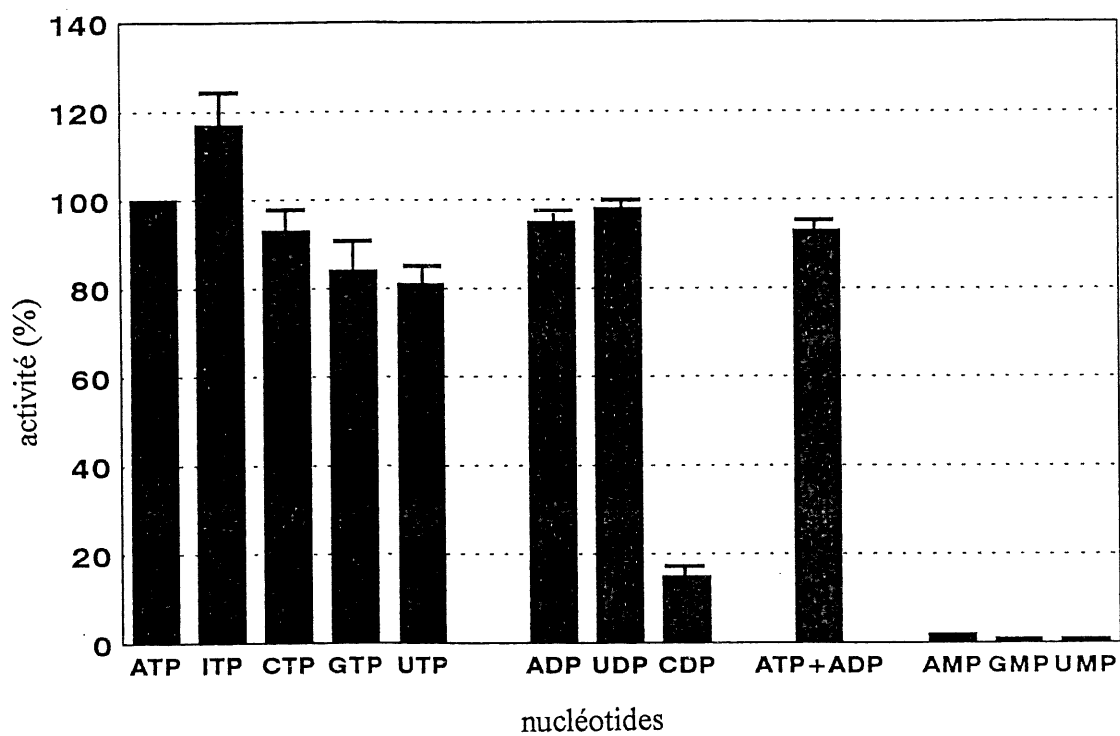
\*-Expérience effectuée trois fois (en triplicata chaque fois)

-L'activité spécifique de la préparation utilisée est de 1,551 U/mg

bien connu de l'adénylate kinase tandis que la ouabaine inhibe la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase. Ces deux inhibiteurs spécifiques n'ont eu aucun effet sur les activités ATPasique et ADPasique de la fraction purifiée. Cependant, le gossypol a inhibé les deux types d'activités. En effet une inhibition de 62% a été observée pour l'activité ATPasique tandis qu'une inhibition de 27% a été observée pour l'activité ADPasique. L'azide de sodium a provoqué une inhibition de 34% pour l'activité ATPasique et une inhibition de 44% pour l'activité ADPasique.

## 2.6. Spécificité de substrat

L'une des particularité des ATPDases est leur capacité d'hydrolyser les triphospho- et les diphosphonucléosides mais non les nucléosides monophosphates. Comme il est possible de l'observer sur l'histogramme de la figure 11, l'enzyme purifiée hydrolyse aussi bien les triphosphonucléosides tel que l'ATP, l'ITP, le CTP, le GTP et l'UTP que les diphosphonucléosides tels que l'ADP et l'UDP. On note un niveau faible pour le CDP qui pourrait s'expliquer par la fiabilité du nucléotide que nous n'avons pas vérifiée. Enfin, l'hydrolyse des nucléosides monophosphate (AMP, GMP, UMP) est pratiquement nulle. Lorsque l'ATP et l'ADP ont été combinés dans le milieu de dosage, il n'y a pas eu d'additivité au niveau de l'accumulation du phosphate inorganique. Cela s'explique par le fait qu'il y a un site catalytique commun pour les deux substrats.



**Figure 11. Spécificité de substrat de l'ATPDase du ventricule de boeuf.** (Expérience effectuée trois fois (en triplicata chaque fois))

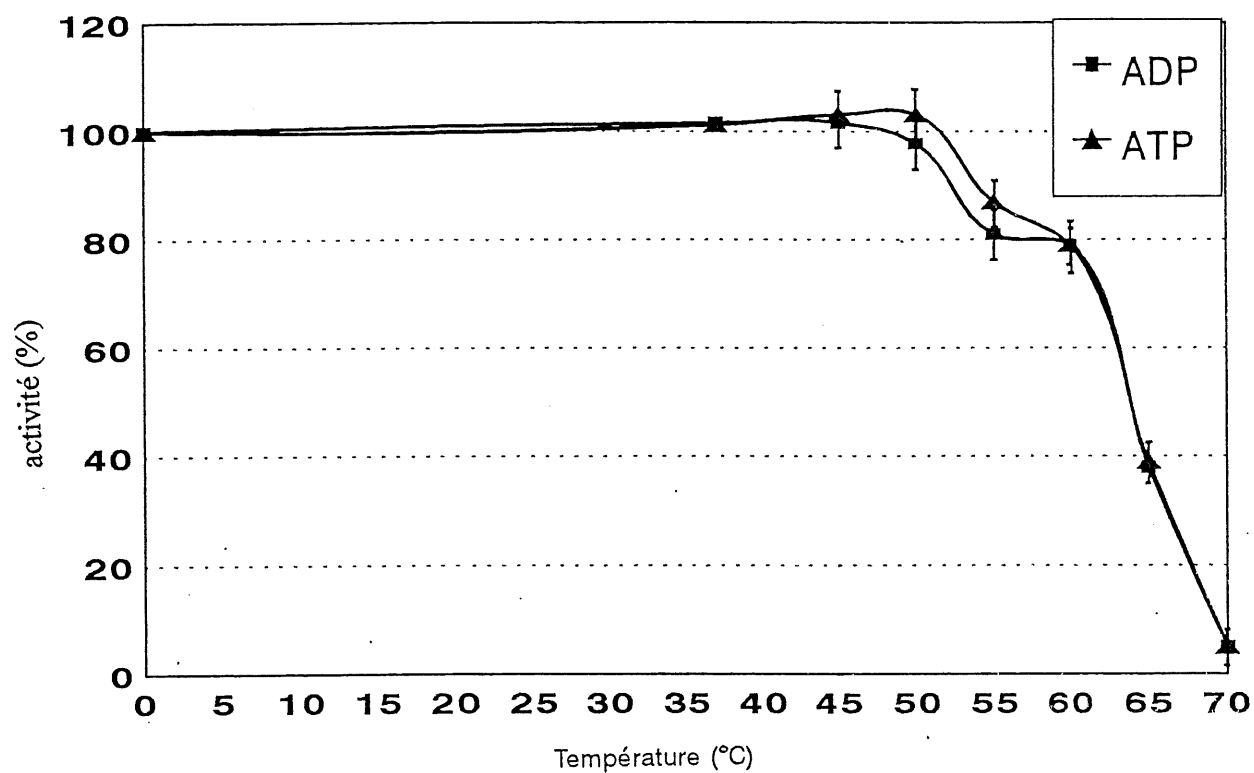


## **2.7. Courbe de dénaturation par la chaleur.**

Ce test avait pour but de confirmer qu'un même site catalytique est responsable de l'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP. Comme il est possible de le voir à la figure 12, les deux courbes d'activité, une avec l'ATP comme substrat et l'autre avec l'ADP comme substrat se superposent confirmant la possibilité d'une seule enzyme impliquée dans l'hydrolyse de l'ADP et de l'ATP.

## **2.8. Western blot**

L'utilisation d'anticorps spécifiques à l'ATPDase est un moyen très fiable pour prouver l'identité de la préparation enzymatique obtenue à la fin de la purification. Comme il est possible de le voir sur la figure 13, l'anticorps de l'ATPDase du pancréas de porc reconnaît l'ATPDase du cœur de boeuf purifié. Deux bandes ont réagi avec l'anticorps, une bande à 78 kDa et une autre à 54 kDa.



**Figure 12. Effet d'un traitement à la chaleur sur l'activité\* enzymatique de l'ATPDase.** (Expérience effectuée trois fois (en triplicata chaque fois)). \*: Moyenne et erreur type.

## 2.9. Immunohistochimie

La dernière vérification qui a été faite quant à l'identité de l'ATPDase des cardiomyocytes bovines est l'immunohistochimie. Cela correspond à la preuve ultime permettant d'une part de confirmer davantage qu'il s'agit bel et bien d'une ATPDase et, en plus, il est possible de localiser la protéine dans la cellule. Une réponse positive avec l'anticorps a été observée directement sur les membranes plasmiques des cardiomyocytes démontrant ainsi que l'ATPDase est réellement présente dans ce type de cellule et qu'en plus elle est possiblement une ecto-enzyme. Une réponse très positive a également été observée sur les fibres de Purkinje et cela fut une très grande surprise. En effet selon les figure 14 et 15, il semblerait qu'une grande partie de l'activité ATPDasique dans le coeur soit concentrée dans ce type de tissu spécialisé dans la conduction des influx nerveux. Il est possible de voir à la figure 14a une coloration par l'hématoxyline et l'éosine (H&E) du myocarde à un grossissement de 200x. Après l'immunolocalisation, on obtient un fort signal sur la membrane des cardiomyocytes (figure 14b). Il est intéressant de noter qu'il semble y avoir un signal positif à l'intérieur de la cellule. La figure 14c démontre que le signal est variable dans les cardiomyocytes. La flèche claire nous montre une cellule où il n'y a pas de signal. A la figure 14d, il est possible de voir que les cellules non-réactives de la photographie précédente ont quand même un signal positif sur leur membrane. La figure 14e est le témoin (sérum pré-immun) et aucun signal n'y apparaît. La figure 15a révèle un fort signal sur les fibres de Purkinje à un grossissement de 200x. La figure 15b est le témoin et il n'y a aucun signal. La figure 15c est un grossissement de 500x de la figure 15a. Les figures 15d et 15e correspondent à des coupes transversales des fibres de Purkinje à 200x. On observe un fort signal sur la membrane plasmique à la figure 15d.

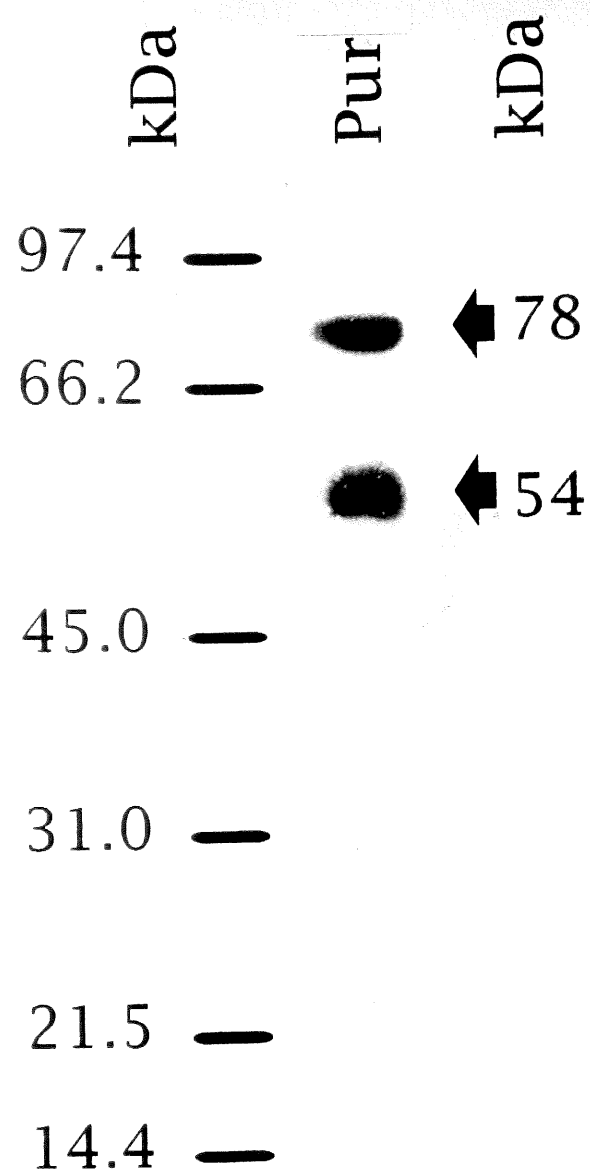


Figure 13. Western blot de l'ATPDase purifiée

**Figure 14. Localisation cellulaire de l'ATPDase dans le myocarde par méthode immunohistochimique (200x).** (A: Coloration à l'hématoxyline et l'éosine (H&E), flèche: myocarde en coupe transversale, tête de flèche: myocarde en coupe longitudinale, flèche claire: veine; B: Immunolocalisation, tête de flèche: fort signal sur la membrane plasmique du myocarde en coupe transversale, flèche claire: fort signal sur la membrane plasmique du myocarde en coupe longitudinale; C: Variation du signal, grosse flèche noire: signal positif, flèche claire: signal négatif, petite flèche: signal positif sur une cellule endothéliale d'une veine; D: Immunolocalisation, signal positif sur les membranes; E: Témoin

**Figure 15. Localisation de l'ATPDase au niveau des fibres de Purkinje par méthode immunohistochimique.** (A: fort signal sur la membrane des fibres de Purkinje (200x); B: Témoin (200x); C: fort signal sur la membrane d'une fibre de Purkinje (500x); D: fort signal sur une coupe transversale des fibres de Purkinje (200x); E: Coloration H&E d'une coupe transversale des fibres de Purkinje (200x).

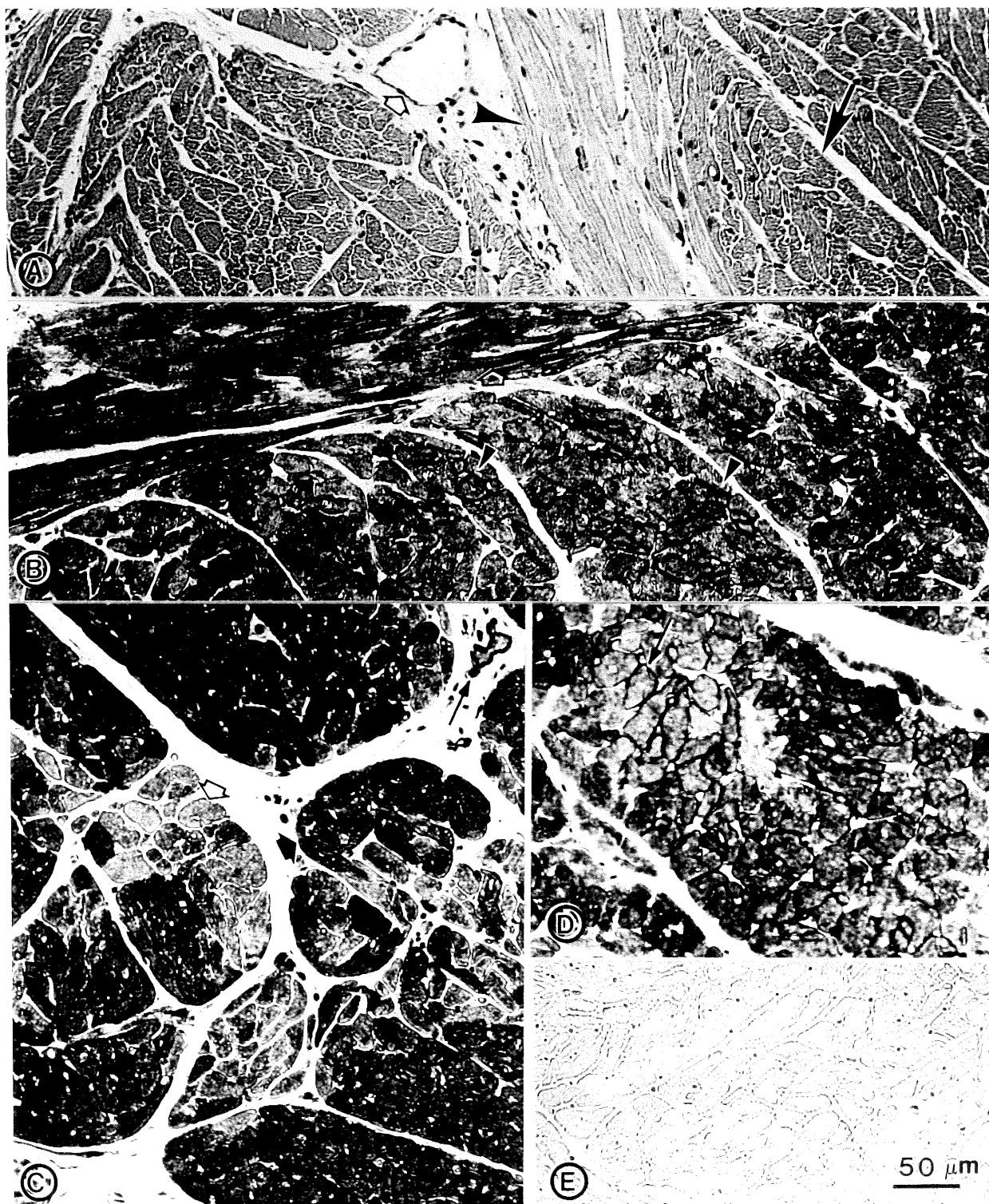


Figure 14

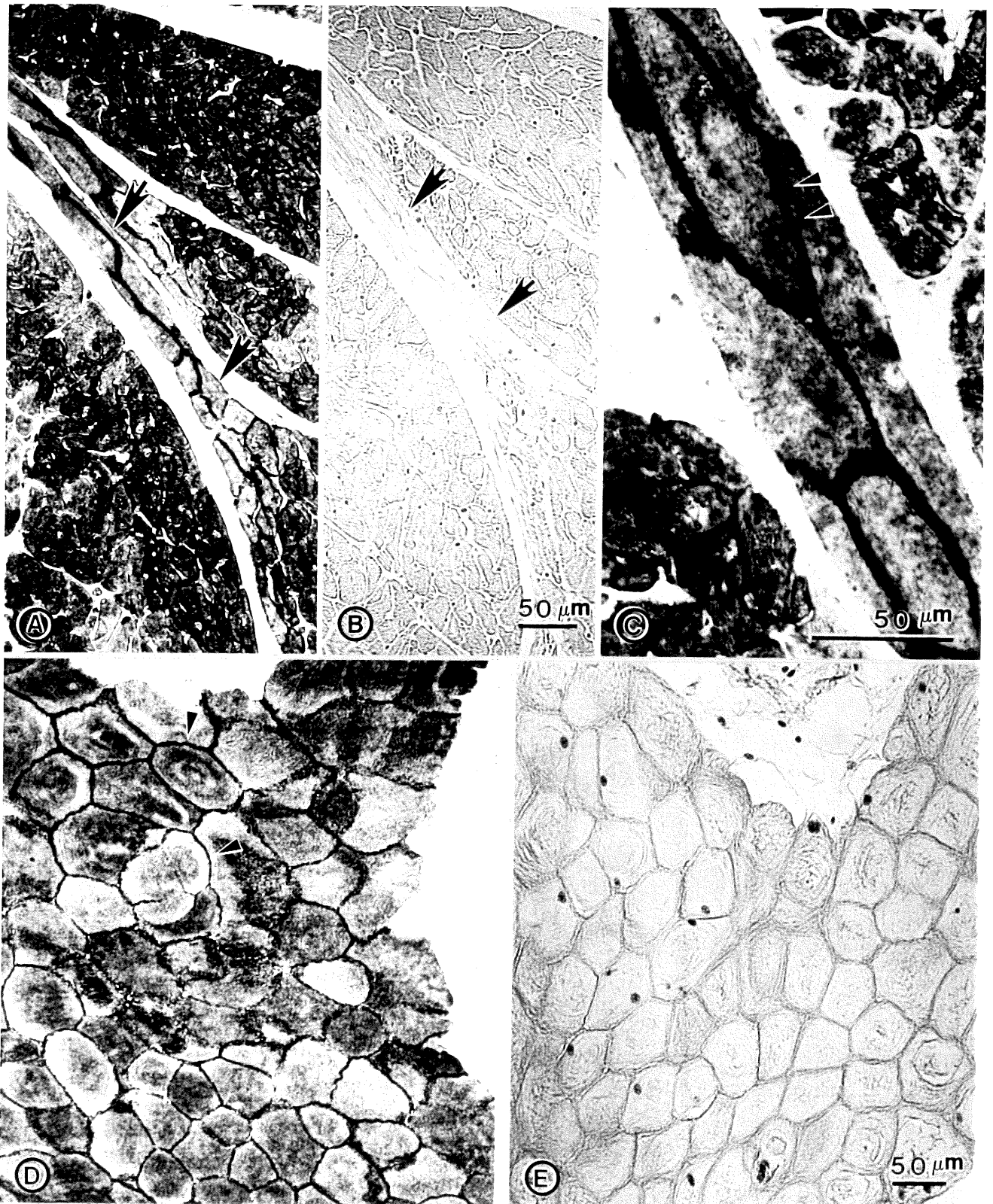


Figure 15

## CHAPITRE III

### DISCUSSION GÉNÉRALE

Depuis les travaux de Medigrecena sur la 5'-nucléotidase en 1911 (Leven et Medigrecena, 1911), plusieurs laboratoires se sont intéressés aux ectonucléotidases présentes dans le coeur des mammifères. Les activités ATPasique et ADPasique à la surface des cellules cardiaques rapportées par Bowdich *et al.* (1985) et par Meghji *et al.* (1992) laissaient suspecter une ATP-diphosphohydrolase. L'objectif principal était donc de purifier l'activité ADPasique dans le ventricule et de vérifier s'il s'agissait d'une ATPDase. Notre hypothèse étant que l'activité ecto-ADPasique des cardiomyocytes est dû à une ATPDase. Le coeur de boeuf a été choisi pour cette étude étant donné qu'il est facilement disponible et qu'on peut prélever les cellules du myocarde sans les cellules endothéliales et les gros vaisseaux coronaires. La procédure de purification est essentiellement la même que celle utilisée pour l'ATPDase des muscles lisses de l'aorte de boeuf (Sévigny *et al.*, 1996).

On remarque que la vitesse relative d'hydrolyse ATP/ADP devient constante (1:1) avec la fraction obtenue de la colonne DEAE, indiquant ainsi qu'il n'y a plus d'autres ATPases ou ADPases présents dans la préparation, excepté l'ATPDase. L'activité spécifique obtenue à la fin de la purification est de 1,55 U/mg (tableau 2), ce qui est relativement faible si on la compare à celle de l'ATPDase des muscle lisses et des cellules endothéliales de l'aorte qui est de 55 U/mg (Sévigny *et al.*, 1996). Il est actuellement difficile d'expliquer pourquoi il y a une aussi grande différence entre ces deux ATPDases au niveau de leur activité



spécifique. Il se peut qu'une activité spécifique aussi basse soit réelle dans le myocarde; dans ce cas, la raison n'est pas encore trouvée. Cependant, l'ATPDase du coeur a pu être inhibée ou inactivée partiellement au cours de la purification. En effet, le Western blot de la figure 13 montre clairement deux bandes ayant réagi avec l'anticorps, une bande à 78 kDa et une autre à 54 kDa, alors que le gel d'électrophorèse en condition non-dénaturante ne révèle qu'une seule bande active. Il se pourrait donc qu'un type d'ATPDase retrouvé dans la fraction purifiée ne soit plus active bien qu'elle soit présente dans la préparation finale. Une explication possible à tout cela serait qu'au cours de la procédure de purification et pour une raison inconnue, il y aurait eu clivage au niveau du site actif de certaines molécules d'ATPDase, donnant ainsi un lot de protéines actives et un lot de protéines inactives. Ces deux lots se sont probablement suivis lors de la procédure de purification à cause de leurs propriétés structurales et chimiques semblables. Ce qui expliquerait la faible activité spécifique retrouvée à la fin de la purification de même que la présence de deux bandes à la figure 13. Il est important de noter également la présence de deux pics d'activités ATPasique et ADPasique à la figure 5. Comme il est expliqué au chapitre 2, seulement le premier pic a été conservé pour la suite de la purification car le deuxième pic correspond au volume de lavage. Il serait donc possible qu'il existe deux formes actives d'ATPDase ayant des propriétés légèrement différentes et que ces deux formes se soient séparées lors de l'étape de purification avec l'Affi-Gel Bleu. L'ATP ne peut être utilisé dans le cas présent pour l'élution de l'ATPDase car il y aurait une trop grande interférence lors du dosage enzymatique et l'ATP serait dégradé par l'enzyme. Deuxièmement, lors de la purification de l'ATPDase de l'aorte bovine, Sévigny *et al.* (sous presse) a testé plusieurs produits (dont le  $\text{NAD}^+$ ) pour l'élution de l'enzyme de cette colonne et il est apparu en conclusion que les tampons d'élution utilisés ici sont ceux avec lesquels les meilleurs résultats sont obtenus. De plus, à la figure

6, deux taches sont visibles à l'étape de la colonne Con A. Il est possible que la préparation finale ne contienne pas seulement un type d'ATPDase mais deux. Ces deux types ayant des propriétés (telles que l'affinité pour les substrats, la stabilité etc..) légèrement différentes. Cependant, la séparation et la caractérisation de ces deux types dépassent le cadre de ce travail.

L'ATPDase a des propriétés uniques que l'on ne retrouve pas chez d'autres ATPases, ADPases ou phosphatases non-spécifiques. Sa caractérisation biochimique permet de prouver hors de tout doute qu'il s'agit bel et bien d'une ATPDase. Comme le montre la figure 7, l'enzyme fonctionne optimalement à un pH de 7,5. Cependant, pour une raison inconnue, l'activité ADPasique ne semble pas varier beaucoup en fonction du pH. L'enzyme a besoin de  $\text{Ca}^{++}$  ou de  $\text{Mg}^{++}$  pour fonctionner. C'est le cas précis de plusieurs ATPDases retrouvées dans différents tissus tels que les muscles lisses de l'aorte de boeuf (Côté *et al.*, 1992), la trachée de boeuf (Picher *et al.*, 1994), le pancréas de porc (Lebel *et al.*, 1980), la rate de boeuf (Moodie *et al.*, 1990), et de bien d'autres tissus (Plesner, 1995). Un  $K_m$  de 29  $\mu\text{M}$  a été calculé pour cette enzyme en présence d'ADP comme substrat (figure 9). Un  $K_m$  de cet ordre implique nécessairement que le site catalytique de l'enzyme n'est pas dirigé vers le cytosol mais plutôt vers le milieu extracellulaire. S'il en était autrement, l'enzyme liquiderait en très peu de temps les réserves de nucléosides tri- et diphosphates de la cellule, ce qui aurait comme conséquence de mettre la survie de cette dernière en danger. La plupart des ATPDases chez les mammifères sont des ectoenzymes et possèdent un  $K_m$  dans l'ordre du micromolaire. C'est le cas par exemple pour l'ATPDase des muscles de la trachée (Picher *et al.*, 1994), du placenta humain (Papamarcaki et Tsolas, 1990), des glandes salivaires, des glandes mammaires et de l'utérus de rat (Valenzuela *et al.*, 1989; 1992).

La migration de l'enzyme en gel d'acrylamide en conditions non-dénaturantes (figure 10) montre que l'activité ATPasique migre exactement à la même hauteur que l'activité ADPasique. Ce gel peut donc nous laisser supposer qu'une seule enzyme est responsable des deux types d'activité. De plus, il n'y a aucune hydrolyse visible lorsque le gel est placé en présence d'AMP, ce qui exclut la possibilité qu'une phosphatase non-spécifique soit présente. De plus, l'utilisation d'inhibiteurs (tableau 3) a permis d'exclure la présence de la  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  ATPase dans la préparation. En effet, la ouabaïne, à une concentration de 3,0 mM, est un inhibiteur spécifique de cette enzyme (Plesner, 1995) et elle n'a eu aucun effet sur les activités ATPasique et ADPasique de la préparation. L'utilisation d' $\text{Ap}_5\text{A}$ , à une concentration de 0,1 mM, a également permis d'exclure la présence d'une adénylate kinase (Plesner, 1995) car aucun effet n'a été observé en présence de cet inhibiteur. Le gossypol, un agent antifertilisant connu pour réduire la concentration d'ATP dans les spermatozoïdes, a inhibé significativement les deux types d'activité soit de 62% et de 27% respectivement pour l'ATPase et l'ADPase. Ce composé a eu des effets d'inhibition semblables, à une concentration de 0,035 mM, avec l'ATPDase des muscles lisses du poumon de boeuf (Picher *et al.*, 1993) et avec l'ATPDase des muscles de la trachée de boeuf (Picher *et al.*, 1994). L'azide de sodium, à des concentrations variant entre 10 et 20 mM, est reconnu pour inhiber significativement l'ATPDase (Dhalla et Zhao, 1988; Plesner, 1995). Ici, des inhibitions par l'azide de sodium de 34% et de 44% ont été observés respectivement pour les activités ATPasique et ADPasique. Selon Plesner (1995), dans plusieurs cas où on est en présence d'une ATPDase, il semblerait que l'activité ADPasique soit inhibée plus fortement par ce composé que l'activité ATPasique ne l'est. C'est ce qui a été observé ici. Les raisons pour lesquelles ces deux activités se comportent différemment face aux inhibiteurs sont présentement inconnues. Cependant, comme il a été expliqué plus haut, il y a peut-être deux isoenzymes dans la

préparation et cela peut avoir une certaine influence sur la caractérisation. Les concentrations en inhibiteur utilisées dans cette présente recherche ont été déterminées de façon à pouvoir effectuer une comparaison valable avec ce qui a déjà été fait par d'autres auteurs (Dhalla et Zhao, 1988; Picher *et al.*, 1993; Plesner, 1995).

Toutes les ATPDases possèdent la particularité d'hydrolyser efficacement les triphospho-et diphosphonucléosides. Comme on peut le voir à la figure 11, la préparation enzymatique purifiée possède une capacité d'hydrolyse très forte pour les triphosphonucléosides tel que l'ATP, l'ITP, le CTP et le GTP. L'ADP et l'UDP, deux diphosphonucléosides sont également fortement hydrolysés par la préparation enzymatique. Le CDP est hydrolysé moins efficacement si on le compare aux autres triphospho- et diphosphonucléosides. En effet, comparativement à l'ATP, le CDP est hydrolysé à 17%. Ceci n'est pas propre à l'ATPDase du coeur de boeuf car d'autres chercheurs ont observé un comportement semblable avec des ATPDases d'autres tissus. Par exemple, la vitesse d'hydrolyse du CDP est 40% celle de l'ATP par l'ATPDase du poumon de boeuf (Picher *et al.*, 1993) et par celle des muscles lisses de la trachée de boeuf (Picher *et al.*, 1994). Toujours relativement à l'hydrolyse de l'ATP, le CDP n'est hydrolysé que de 31% par l'ATPDase des synaptosomes du cortex cérébral de rat (Battastini *et al.*, 1991). Il est difficile d'expliquer la raison de tout cela. Ce comportement des ATPDases avec le CDP sera probablement clarifié lorsque la structure tertiaire de l'enzyme sera modélisée. La figure 11 montre également que l'hydrolyse des nucléosides monophosphates est presque nulle. C'est une des caractéristiques des ATPDases. De plus la combinaison d'ATP et d'ADP dans le milieu d'incubation n'a aucun effet d'additivité sur la libération de phosphate inorganique. Ceci

prouve que l'hydrolyse de ces deux substrats s'effectue au même site catalytique. La courbe de dénaturation par la chaleur de la figure 12 démontre encore une fois, mais de façon indirecte, que l'hydrolyse de l'ATP et de l'ADP s'effectue par le même site catalytique. De plus, le profil de la figure 12 est parfaitement superposable avec le profil obtenu pour les ATPDases de l'aorte de boeuf (Côté *et al.*, 1992), du poumon de boeuf (Picher *et al.*, 1993) et celui de la trachée de boeuf (Picher *et al.*, 1994).

La confirmation ultime de l'identité de cette enzyme, à savoir qu'elle est effectivement une ATPDase, vient du Western blot représenté à la figure 13. Sur cette figure, la détection a été effectuée à l'aide d'un anticorps dirigé contre la séquence du N-terminal de l'ATPDase du pancréas de porc (type I). L'anticorps a reconnu spécifiquement deux bandes, l'une à 54 kDa et une autre à 78 kDa. Ces deux bandes correspondent respectivement à l'ATPDase de type I que l'on retrouve dans le pancréas de porc et à l'ATPDase de type II que l'on retrouve dans les muscles lisses et les cellules endothéliales de l'aorte de boeuf. A l'aide de ces mêmes anticorps, la localisation immunohistochimique de l'enzyme a été effectuée et, tel que montré à la figure 14, l'enzyme semble être localisée sur la membrane plasmique des cardiomyocytes ainsi que sur la membrane plasmique des fibres de Purkinje. Des informations supplémentaires sur la localisation cellulaire du site actif de cette enzyme ont récemment été obtenues à partir d'études moléculaires. En effet, le gène codant pour l'ATPDase a récemment été cloné (Wang et Guidotti, 1996) et il correspond au gène de la protéine CD39. Cette dernière est un marqueur de la surface cellulaire des lymphocytes. De plus, l'expression du cDNA de l'ATPDase ou du CD39 dans les cellules humaines COS démontre hors de tout doute qu'il s'agit d'une ectonucléotidase qui possède les deux types d'activités ATPasique et ADPasique. Ces observations confirment le fait que l'ATPDase est une ectoenzyme et appuient les observations préalablement effectuées sur les cellules musculaires lisses de la trachée de boeuf (Picher *et al.*,

1994). Cependant, à la figure 14b, on observe par immunolocalisation une réponse positive dans le cytoplasme des cellules. Ce signal positif est peut-être imputable au transport vers la membrane plasmique de l'ATPDase nouvellement synthétisée. Une autre hypothèse serait qu'il existe une forme soluble de l'ATPDase. Cela pourrait expliquer la présence d'activité ADPasique dans le surnageant cellulaire (S2) observée au cours de la purification (tableau 1).

Cette démonstration de la présence d'une ATPDase dans le coeur amène de nouvelles questions concernant la source des nucléotides extracellulaires dans cet organe, sa localisation histologique et sa fonction. Les nucléotides extracellulaires peuvent potentiellement avoir comme origine les cellules myocardiales intactes ou endommagées ou bien les tissus nodaux et conducteurs. Les nucléotides peuvent également provenir du système circulatoire lui-même. En effet, une augmentation de la concentration de nucléotides, tel que l'ATP, a été observé dans la circulation en moins de 5 minutes après un exercice physique intense (Parkinson, 1973). Une fois relâché, l'ATP et ses métabolites (ADP, AMP, adénosine et adénine) exercent des effets physiologiques via les purinorécepteurs. La localisation immunohistochimique démontre que l'ATPDase est localisée stratégiquement autant sur les membranes plasmiques des cellules myocardiques banales que sur les fibres de Purkinje. En considérant la très forte affinité de l'ATPDase pour l'ATP et l'ADP et en considérant sa localisation, il est possible de conclure que cette ATPDase est capable d'effectuer une conversion rapide de l'ATP en AMP dans l'environnement immédiat des fibres de Purkinje et des cellules myocardiales. Ceci permettrait donc d'éliminer le danger de détérioration des cellules. Ce danger étant imputable à la présence d'une très forte concentration d'ATP et d'ADP dans l'environnement immédiat de la cellule. En même temps, l'enzyme permet de supprimer rapidement

les effets physiologiques médiés par les purinorécepteurs de type  $P_2$ , induits par l'ATP dans le ventricule et les vaisseaux sanguins. On peut croire qu'à mesure que la concentration d'ATP et d'ADP décroît, la 5'-nucléotidase convertirait l'AMP en adénosine, favorisant ainsi l'activation des purinorécepteurs  $P_1$  ou l'entrée de l'adénosine dans les cellules par l'entremise des transporteurs membranaires.

Dans une revue récente, Belardinelli *et al.*, (1995) ont décrit les effets de l'adénosine sur les cellules cardiaques. Certaines généralisations concernant les réponses électrophysiologiques à l'adénosine des cellules ventriculaires peuvent être résumés ici. Premièrement, l'adénosine seule n'a pratiquement aucun effet sur la durée du potentiel d'action et sur la force de contraction des cellules ventriculaires qui ne montrent pas une activation des courants potassiques induits par l'acétylcholine et l'adénosine. Deuxièmement, l'adénosine écourte la durée du potentiel d'action chez les myocytes qui possèdent un courant potassique activé par l'acétylcholine et l'adénosine ("Acetylcholine and adenosine-regulated potassium outward current"), ceci étant suffisant pour causer une réduction de la force de contractilité. Troisièmement, l'adénosine et ses analogues sont des antagonistes potentiels de l'effet inotrope positif induit par les catécholamines (adrénaline et noradrénaline) sur le myocarde ventriculaire. Selon Bellardinelli *et al.* (1995), il est raisonnable de penser que l'action antiarythmique et l'action proarythmique de l'adénosine dans le coeur des mammifères sont les résultats d'une activation directe de l'entrée des ions potassium dans les cellules supraventriculaires et d'une inhibition de la stimulation des courants ioniques dans le myocarde auriculaire et ventriculaire. Bien sûr, l'ATPDase n'est pas la seule ectonucléotidase qui convertit l'ATP et l'ADP en adénosine dans le coeur. Cependant, de par ses propriétés biochimiques, cette enzyme semble être un contributeur majeur dans ce processus de conversion des nucléotides extracellulaires.

## CONCLUSION

Les deux objectifs de cette étude ont été atteints. Premièrement, l'activité ADPasique des cellules du coeur de boeuf a été purifiée. Deuxièmement, la préparation enzymatique obtenue a été caractérisée. La purification et la caractérisation de l'activité ADPasique dans le coeur ont confirmé l'hypothèse de départ à savoir qu'une ATPDase est responsable de l'activité ADPasique à la surface des cellules cardiaques. En effet, à partir de la colonne DEAE, une copurification des activités ATPasique et ADPasique fut observée. Les points suivants constituent les arguments principaux servant à confirmer l'hypothèse: (1) l'enzyme hydrolyse efficacement les triphospho-et diphosphonucléosides mais non les nucléosides monophosphates; (2) il n'y a pas d'effet d'additivité sur la libération du phosphate inorganique lorsque l'ATP et l'ADP sont présents en même temps dans le milieu d'incubation; (3) le profil de dénaturation de l'enzyme par la chaleur est le même pour les deux types de substrats (ATP et ADP); (4) l'électrophorèse en conditions non-dénaturantes montre une migration identique pour les activités ATPasique et ADPasique; (5) un anticorps spécifique à l'ATPDase du pancréas de porc a réagi positivement avec la préparation purifiée du coeur. En plus d'identifier l'ATPDase dans le coeur, les tests d'immunohistochimie ont permis d'effectuer sa localisation précise dans le tissu. Ainsi, comme il était présumé, l'ATPDase est présente à la surface de la membrane plasmique des cellules myocardiques banales. Elle est aussi présente sur la membrane plasmique des cellules constituant le tissu conducteur, plus précisément les fibres de Purkinje. Il est important de noter que les résultats présentés ici laissent suspecter la présence de deux isoenzymes dans le myocarde. Il serait bon de vérifier cette hypothèse dans une recherche future.



Ces observations soulèvent de nouvelles questions sur le rôle de l'adénosine et de l'ATP au niveau de la transmission des influx dans le réseau des fibres de Purkinje. De plus, le contrôle de la concentration de l'ATP et de l'ADP extracellulaires dans l'environnement immédiat des fibres de Purkinje semble être d'une importance capitale étant donné le niveau élevé de l'ATPDase à la surface de ces cellules. En effet, l'ATPDase, en convertissant l'ATP en adénosine, annule les effets physiologiques médiés par les purinorécepteurs  $P_2$  et induit des réponses physiologiques médiés par les purinorécepteurs  $P_1$ . Ainsi, la puissance de contraction du myocarde de même que l'apport d'oxygène vers les tissus peuvent être adaptés au besoin immédiat du coeur.

## BIBLIOGRAPHIE

BAILLET, J. et E. NORTIER. 1992. Précis de Physiologie humaine. Édition Marketing, éditeurs des préparations Grandes Écoles Médecine. Paris.

BALCELLS, E., J. SUAREZ et R. RUBIO. 1993. Implication of the Coronary Vascular Endothelium as mediator of the Vasodilatory and Dromotropic Actions of Adenosine. J. Mol. Cell Cardiol. 25:693-706.

BATTASTINI, A.M.O., J.B.T.da ROCHA, C.K. BARCELLOS, R.D. DIAS et J.J.F. SARKIS. 1991. Characterization of an ATP Diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in Synaptosomes from Cerebral Cortex of Adult Rats. Neuro. Resear. vol.16 no.12:1303-1310.

BAYKOV, A.A., O.A. EVTUSHENKO et S.M. AVAEVA. 1988. A malachite green procedure for orthophosphate determination and its use in alkaline phosphatase-based enzyme immuno-assay. Anal. Biochem. 171:266-270.

BEAUDOIN, A.R., J. SEVIGNY et M. PICHER. In Treatise on biomembranes: ATP-diphosphohydrolase, apyrase and nucleotides phosphohydrolases: biochemical properties and function. (A.G. Lee, ed.), vol. 6. JAI Press inc. Greenwich, CT. Sous presse.

BELARDINELLI, L., W.R. GILES et A. WEST. 1988. Ionic mechanism of adenosine actions in pace maker cells from rabbit heart. J. Physiol. Lond., 405:615-633.

BELARDINELLI, L. et G. ISENBERG. 1983. Isolated artial myocyte: adenosine and acétylcholine increase potassium conductance. Am. J. Physiol. 244:H734-737.

BELARDINELLI, L., J. LINDEN et R.M. BERNE. 1989. The Cardiac Effect of Adenosine. Prog. Cardiovasc. Dis. 32:73-97.

BELARDINELLI, L., J.C. SHRYOCK, Y. SONG, D. WANG et M. SRINIOAS. 1995. Ionic basis of the electrophysiological actions of adenosine on cardiomyocytes. FASEB J. 9:359-365.

BELHASSEN, B. et A. PELLEG. 1984. Electrophysiologic Effect of Adenosine Triphosphate and Adenosine on the Mammalian Heart: Clinical and Experimental Aspects. J. Am. Coll. Cardio. 4:414-424.

BERNE, R.M., 1980. The Role of Adenosine in the Regulation of Coronary Blood Flow. Circ. Res. 47:807-813.

BOWDICH, J., S. NIGDIKAR, A.K. BROWN et J.W. DOW. 1985. 5'nucleotidase activity of isolated mature rat cardiac myocytes. Biochim. Biophys. Acta. 845:21-26.

BRADFORD, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72:248-254.

BURNSTOCK, G. 1978. In cell membrane receptors for drugs and hormones: a multidisciplinary approach. L. Bolis & R.W. Straub, eds., 107-118. Ravec Press, New York, NY.

BURNSTOCK, G. 1990. Purinergic mechanisms. In: Biological actions of extra-cellular ATP. Ann. N.Y. Acad Sci. 603:1-18.

BURNSTOCK, G. et P. MEGHJI. 1983. The effect of adenylyl compounds on rat heart. Br. J. Pharmacol. 79:211-218.

COLLIS, M.G. et S.J. PETTINGER. 1982. Can ATP stimulate P<sub>1</sub> receptors in guinea pig atrium without conversion to adenosine. Eur. J. Pharmacol. 81:521-529.

COTÉ, Y.P., J.G. FILEP, B. BATTISTINI, J. GAUVREAU, P. SIROIS et A.R. BEAUDOIN. 1992. Characterization of ATP-diphosphohydrolase activities in the intima and media of the bovine aorta: evidence for a regulatory role in platelet activation in vitro. Biochim. Biophys. Acta. 1139:133-142.

COTÉ, Y.P., M. PICHER, P. ST-JEAN, R. BÉLIVEAU, M. POTIER et A.R. BEAUDOIN. 1991. Identification and localisation of ATP- diphosphohydrolase (apyrase) in the bovine aorta: relevance to vascular tone and platelet aggregation. Biochim. Biophys. Acta. 1078:187-181.

CUSACK, N.J. 1990. Subtypes of P<sub>2</sub>-Purinoceptors. In: Biological actions of extracellular ATP. Ann. N.Y. Acad. Sci. 603:172-181.

DE VENDE, J. J. VELEMA et J. ZAAGSMA. 1984. Properties and Subcellular Localization of Adenosine Diphosphatase in Rat Heart. Arch. Biochem. Biophys. 233:180-187.

DE YOUNG, M.B. et A. SCARPA. 1990. A  $P_2$ -Purinoceptor on Cardiac Cells Mediates a Cytosolic  $[Ca^{2+}]$  Response Requiring  $Ca^{2+}$  Influx, Intracellular  $Ca^{2+}$  Store, and Extracellular Phosphate. In: Biological actions of extracellular ATP. Ann. N.Y. Acad. Sci. 603:464-465.

DHALLA, N.S. et D. ZHAO. 1989. Cell membrane  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ATPase. Prog. Biophys. Molec. Biol. 52:1-37.

DHALLA, N.S., M.B. ANAND-SRIVASTAVA, B.S. TUANA et R.L. KHANDELWAL. 1981. Solubilization of calcium dependant adenosine triphosphatase from rat heart sarcolemma. J. Mol. Cell. Cardiol. 13:413-423.

DHALLA, N.S. et D. ZHAO. 1988. Cell membrane  $Ca^{2+}/Mg^{2+}$  ATPase. Prog. Biophys. Molec. Biol. 52:1-38

DRURY, A.N. and A. SZENT-GYORGYI. 1929. The physiological activity of adenosine compounds with especial reference to their action upon the mammalian heart. J. Physiol. (London) 68:213-237.

FLEETWOOD, G. et J.L. GORDON. 1987. Purinoceptors in the rat heart. Br. J. Pharmacol. 90:219-227.

FORRESTER, T. 1990. Release of ATP from heart. In: Biological action of ATP. Ann. N.Y. Acad. Sci. 603:335-352.

FORRESTER T. et C.A. WILLIAMS. 1977. Release of adenosine triphosphate from isolated adult heart cells in response to hypoxia. J. Physiol. 268:371-390.

FREDHOLM, B.B., P. HEDQVIST, K. LINDSTROM et M. WENNMALM. 1982. Release of nucleosides and nucleotides from the rabbit heart by sympathetic nerve stimulation. Acta Physiol. Scand. 116:285-295.

FRICK, G.P. et M. LOWENSTEIN. 1976. Studies of 5'-Nucleotidase in the Perfused Rat Heart. J. Biol. Chem. vol. 251 No. 22:6372- 6378.

HARLOW, E. et D. LANE. 1988. In Antibodies: A Laboratory Manual. Harlow E. éd. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.

HOPWOOD, A.M. et G. BURNSTOCK. 1987. ATP mediate coronary vasoconstriction via P2x purinoceptor and coronary vasodilatation via P2y purinoceptor in the isolated perfused rat heart. Eur. J. Pharmacol. 136:49-54.

HOPKINS, S.V. 1973. The action of ATP in the guinea pig heart. Biochem. Pharmacol. 22:335-339.

HORI, M. et M. KITAKAZE. 1991. Adenosine, the Heart, and Coronary Circulation. Hypertension, v.18, no5:565-574.

KETTLUN, A.M., L. URIBE, V. CALVO, S. SILVA, J. RIVERA, M. MANCILLA, M.A. VALENZUELA et A. TRAVERSO-CORI. 1982. Properties of two apyrase from *Solanum tuberosum*. *Phytochem.* 21:551-558.

KNOWLES, A.F., R.E. ISLER et J.F. REECE. 1983. The common occurrence of ATP diphosphohydrolase in mammalian plasma membranes. *Bioch. Biophys. Acta.* 731:88-96.

LAEMMLI, U.K. 1970. Clivage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685

LALIBERTÉ, J.F. et A.R. BEAUDOIN. 1983. Sequential hydrolysis of the  $\gamma$  and  $\beta$ -phosphate groups of ATP by the ATP-Diphosphohydrolase from pig pancreas. *Biochim. Biophys. Acta.* 742:9-15.

LALIBERTÉ, J.F., P. ST-JEAN et A.R. BEAUDOIN. 1982. Kinetic Effects of  $\text{Ca}^{2+}$  and  $\text{Mg}^{2+}$  on ATP Hydrolysis by the Purified ATP Diphosphohydrolase. *J. Biol. Chem.* 257:3869-3874

LEBEL, D., G.G. POIRIER, S. PHANEUF, P. ST-JEAN, J.F. LALIBERTÉ et A.R. BEAUDOIN. 1980. Characterization and Purification of a Calcium-sensitive ATP-Diphosphohydrolase from Pig Pancreas. *J. Biol. Chem.* 255:1227-1233.

LEVEN, P.A. et F. MEDIGRECENA. 1911. On Nucleases. *J. Biol. Chem.* 9:65-83.

LONDOS, C.D., M.F. COOPER et J. WOLFF. 1980. Subclasses of external adenosine receptors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 77:2551-2554.

LOSSNITZER, K., G. PFENNIGSDORF et H. BRAUER. 1983. Myocarde, Vaisseaux, Calcium. K.A.G. Ludwigshafen editeur. Munchen.

MALOUF, N.N. et G. MEISSNER. 1980. Cytochemical Localization of a "Basic" ATPase to Canine Myocardial Surface Membrane. J. Histochem. Cytochem. 28:1286-1294.

MARCUS, A.J. et L.B. SAFIER. 1993. Thromboregulation: multicellular modulation of platelet reactivity in hemostasis and thrombosis. FASEB J. 7:516-522.

McNAMARA, D.B., J.N. SNIGH et N.G. DHALLA. 1974. Properties of Some Heart Sarcolemmal-bound Enzymes. J. Biochem. 76:603-609.

MEGHJI, P., J.D. PEARSON et L.L. SLAKEY. 1992. Regulation of extracellular adenosine production by ectonucleotidases of adult rat ventricular myocytes. Am J. Physiol. 263:H40-H47.

MERRIL, C.R. 1990. Methods Enzymol. 182:477-488.



MIURA, Y., K. HIROTA, Y. ARAI et K. YAGI. 1987. Purification and partial characterization of adenosine diphosphatase activity in bovine aorta microsomes. *Thromb. Res.* 46:685-695.

MOODIE, F.D.L., H. BAUM, P.J. BUTTERWORTH et T.J. PETERS. 1991. Purification and characterisation of bovine spleen ADPase. *Eur. J. Biochem.* 202:1209-1215.

OLSSON, R.A. et J.D. PEARSON. 1990. Cardiovascular purinoceptors. *Physiological Reviews.* 70(3):761-845.

PAPAMARCAKI, T. et O. TSOLAS. 1990. Identification of ATP-diphosphohydrolase activity in human term placenta using a novel assay for ATP. *Mol. Cell. Biochem.* 97:1-8.

PARKINSON, P.I. 1973. Proceedings: the effect of graduated exercise on the concentration of adenine nucleotides in plasma. *J. Physiol. (Lond)* 234(2):72-74.

PELLEG, A., C.M. HURT and I.L. MICHELSON. 1990. Cardiac effects of adenosine and ATP. In: *Biological action of extracellular ATP.* *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 603:19-30.

PICHER, M., Y.P. COTÉ, R. BÉLIVEAU, M. POTIER et A.R. BEAUDOIN. 1993. Demonstration of a Novel Type of ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5) in the Bovine Lung. *J. Biol. Chem.* 268:4699-4703.

PICHER, M., R. BELIVEAU, M. POTIER, D. SAVARIA, E. ROUSSEAU et A.R. BEAUDOIN. 1994. Demonstration of an ecto ATP-diphosphohydrolase (EC 3.6.1.5.) in non-vascular smooth muscles of the bovine trachea. *Biochim. Biophys. Acta.* 1200:167-174.

PLESNER, L. 1995. Ecto-ATPases: Identities and functions. *Int. Rev. Cytol.* 158:141-214.

SARKIS, J.J.F., J.A. GUIMARAES and C. RIBEIRO. 1986. Salivary apyrase of *Rhodnius prolixus*. *Biochem. J.* 233:885-891.

SEVIGNY, J. et A.R. BEAUDOIN. 1994. Le monde des nucléotides extracellulaires. *Médecine/Sciences* 10:836-844.

SEVIGNY, J., Y.P. COTE et A.R. BEAUDOIN. 1995. Purification of pancreas Type I ATP-diphosphohydrolase and identification by affinity labeling with the 5'-p-fluorosulphonylbenzoyl adenosine ATP analogue. *Biochem. J.* 312:351-356.

SEVIGNY, J., F.P. LEVESQUE, G. GRONDIN et A.R. BEAUDOIN. 1996. Purification of the Blood Vessels ATP Diphosphohydrolase, Identification and Localisation by Immunological Techniques. *Biochim. Biophys. Acta.* Sous Presse.

TRAVERSO-CORI, A., H. CHAIMOVICH et O. CORI. 1965. Kinetic Studies and Properties of Potato Apyrase. *Arch. Biochem. Biophys.* 109:173-184.

TUANA, B.S. et N.S. DHALLA. 1982. Purification and characterisation of  $\text{Ca}^{++}$ -dependant ATPase from heart sarcolemma. J. Biol. Chem. 257:14440-14445.

TUANA, B.S. et N.S. DHALLA. 1988. Purification and characterization of a  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$  ecto-ATPase from rat heart sarcolemma. Mol. Cell. Biochem. 81:75-88.

VALENZUELA, M.A., J. LOPEZ, M. DEPIX, M. MANCILLA, A.M. KETTLUN, L. CATALAN, M.CHIONG, J. GARRIDO et A. TRAVERSO-CORI. 1989. Comparative subcellular distribution of apyrase from animal and plant sources. Characterization of microsomal apyrase. Comp. Biochem. Physiol. 93B:911-919.

VALENZUELA, M.A., L. COLLADOS, A.M. KETTLUN, M. MANCILA, H. LARA, J. PUENTE, E. ARANDA, L. ALVAREZ et A. TRAVERSO-CORI. 1992. Changes in apyrase activity in uterus and mammary gland during the lactogenic cycle. Comp. Biochem. Physiol. 103b:113-118.

VANDER A.J., J.H. SHERMAN, D.S. LUCIANO et J.R. GONTIER. 1989. Physiologie humaine. Deuxième éd. McGraw-Hill, Montréal.

VAN CALKER, D., M. MULLER et B. HAMPRECHT. 1978. Nature. 276:839-841.

VARA, F. et F. SERRANO. 1981. Purification and characterisation of a membrane-bound ATP-diphosphohydrolase from *Cicer arietinum* (chic pea) roots. Biochem. J. 197:637-643.

VASCONCELOS, E.G., P.S. NASCIMENTO, M. NAZARETH, L. MEIRELLES, S. VERJOVSKI-ALMEIDA et S.T. FERREIRA. 1993. Characterization and localisation of an ATP-diphosphohydrolase on the external surface of the tegument of *Schistomosa mansoni*. Mol. Biochem. Parasito. 58:205-214.

WANG, T.F. et M.G. GUIDOTTI. 1996. CD39 is a ecto-(Ca<sup>2+</sup>, Mg<sup>2+</sup>)-Apyrase. J. Biol. Chem. 271:9898-9901.

WILLIAMS, C.A. et T. FORRESTER. 1983. Possible source of adenosine triphosphate released from rat myocytes in response to hypoxia and acidosis. Cardiovasc. Res. 17:301-312.

WILLEMOT, J. et D.M. PATON. 1981. Metabolism and presynaptic inhibitory activity of 2',3' and 5'-adenosine nucleotides in rat *vas deferens*. Arch. Pharmacol. 317:110-114.

YAGI, K., Y. ARAI, N. KATO, K. HIROTA et Y. MIURA. 1989. Purification of ATP diphosphohydrolase from bovine aorta microsomes. Eur. J. Biochem. 180:509-513.

ZHAO, D., ELIMBAN, V. et N.S. DHALLA. 1991. Characterisation of the purified rat heart plasma membrane Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> ATPase. Mol. Cell. Biochem. 107:151-160.

ZINCHUK, V.S. and A.V. BULAVKA. 1992. Ultracytochemical demonstration of Ca<sup>++</sup>-ATPase activity in the rat cardiac muscle. Exp. Toxic. Pathol. 44:150-153.

ZHENG, J.S., M.B. DE YOUNG, E. WIENER, M.N. LEVY et A. SCARPA. 1990. Extracellular ATP-induced  $\text{Ca}^{2+}$  Transients in Cardiac Myocytes Are Potentiated by an Increase in Cellular cAMP. In: Biological actions of extracellular ATP. Ann. N.Y. Acad. Sci. 603:448-451.